

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/020617 A1

(51) 国際特許分類:
D06P 3/08 // (C12N 9/02, C12R 1:645)

C12N 9/02,

(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591
大阪府 大阪市 中央区 大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMM
ビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka
(JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2003/010897

(22) 国際出願日:

2003 年 8 月 28 日 (28.08.2003)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-251910 2002 年 8 月 29 日 (29.08.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
マンダム (MANDOM CORPORATION) [JP/JP]; 〒
540-8530 大阪府 大阪市 中央区 十二軒町 5 番 1 2 号
Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 辻野 義雄
(TSUJINO, Yoshio) [JP/JP]; 〒658-0003 兵庫県 神戸市
東灘区 本山北町 4-7-5 4 Hyogo (JP). 園藤 勝義
(ENDO, Katsunori) [JP/JP]; 〒658-0051 兵庫県 神戸市
東灘区 住吉本町 2-6-1 2 Hyogo (JP). ハサンアブ
ルカイル ムハマド カムルル (HASAN, Abul Khaer
Mohamad Quamrul) [BD/JP]; 〒658-0032 兵庫県 神戸
市 東灘区 向洋町中 5-5-5 3 1-7 2 2 Hyogo (JP).

添付公開書類:

一 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CULTURE HAVING PHENOL OXIDASE-LIKE ACTIVITY

(54) 発明の名称: フェノールオキシダーゼ様活性を有する培養物

(57) Abstract: It is intended to provide means of efficiently, economically and conveniently dyeing fibers or hair, bleaching pulp or fibers, removing phenol compounds from liquid wastes, degrading endocrine disruptors, producing phenolic resins, producing artificial lacquer coatings, improving wood qualities, etc. A culture of a strain belonging to the genus *Flammulina*; a culture originating in the above strain which is obtained by culturing the strain at a pH value exceeding 7 and has a phenol oxidase-like activity; a process for producing the culture; a dyeing method which comprises contacting a subject to be dyed with a dye in the presence of the above culture; and a dyeing composition containing the above culture.

(57) 要約: 繊維や毛髪の色染、パルプ及び繊維の漂白、廃液中のフェノール化合物の除去、内分泌攪乱物質の分解、フェノール樹脂の製造、人工塗料の製造、木質の改善等を、効率よく、安価に、かつ簡便に行なう手段を提供すること。フラムリナ属菌類の培養物、該菌類を、pH7を超えるpH条件下で培養して得られ、かつフェノールオキシダーゼ様活性を有する、該菌類由来の培養物、該培養物の製造法、該培養物の存在下に、染色対象物と染料とを接触させる、染色方法、並びに該培養物を含有した染色用組成物。

WO 2004/020617 A1

明細書

フェノールオキシダーゼ様活性を有する培養物

技術分野

本発明は、フェノールオキシダーゼ様活性を有する培養物及びその製造方法、染色方法並びに染色用組成物に関する。より詳しくは、繊維や毛髪の染色、パルプ及び繊維の漂白、廃液中のフェノール化合物等の除去、内分泌攪乱物質の分解、フェノール樹脂の製造、人工漆塗料の製造、木質の改善等に有用な培養物、簡便、安価で、かつ大量に該培養物を得ることができる製造方法、種々の染料による染色が可能な、繊維や毛髪等の染色方法、並びに該染色に有用な染色用組成物に関する。

背景技術

フェノール化合物、ポリフェノール化合物等の種々の基質に対して酸化作用を示す酸化酵素は、主に、ペルオキシダーゼ類とフェノールオキシダーゼ類との2つのグループに分類されうる。

前記ペルオキシダーゼ類は、種々の基質の酸化を触媒し、共通の基質として、反応系中に過酸化水素の存在を必要とする。一方、フェノールオキシダーゼ類は、種々の基質の酸化を触媒し、共通の基質として、分子状酸素の存在を必要とする。したがって、既知の酸化酵素類の中でも、前記フェノールオキシダーゼ類は、大気中の酸素の存在下で種々の基質の酸化を触媒することができるため、酸素存在下で中間体としてのラジカル種の生成に起因する発色、脱色、重合、分解等の多様な化学反応に適する。

前記フェノールオキシダーゼ類は、反応中間体として生成するラジカル種的作用に基づく多様な触媒能を有する。例えば、メディエーターとしてフェノチアジ

ン-10-プロピオン酸を用いた場合、フェノールオキシダーゼ類であるラッカーゼによるインジコの分解反応を効率よく行なうことができることが開示されている（平成 13 年度 福井大学地域共同研究センター 高度技術研修資料集、第 55 頁）。

前記酸化酵素は、従来から種々の植物、細菌類及び真菌類等に見出されている。例えば、植物では、ウルシ科(Anacardiaceae)の分泌性導管、桃類、栗類、マキ科(Podocarpaceae)等において、前記酸化酵素が見出されている。真菌類では、不完全菌亜門(Deuteromycotina)に属する、アスペルギルス(*Aspergillus*)、ボトリティス(*Botrytis*)、ミロセシウム(*Myrothecium*)、ペニシリウム(*Penicillium*)、ペスタロチア(*Pestalotia*)、リゾクトニア(*Rhizoctonia*)等；担子菌亜門(Basidiomycotina)に属する、プロイロータス(*Pleurotus*)、レンティナス(*Lentinus*)、ポリポラス(*Polyporus*)、トラメテス(*Trametes*)、コリオラス(*Coriolus*)等；子囊菌亜門(Ascomycotina)に属するポドスポラ(*Podospora*)、ノイロスポラ(*Neurospora*)、モノシリウム(*Monocillium*)等において、前記酸化酵素が見出されている。細菌では、バチルス(*Bacillus*)、アゾスピリウム(*Azospirillum*)、ストレプトミセス(*Streptomyces*)、アエロバクタ(*Aerobacter*)等において、前記酸化酵素が見出されている。また、担子菌(Basidiomycetes)である食用キノコでは、例えば、スエヒロタケ(*Schizophyllum commune*)、カワラタケ(*Coriolus versicolor*)、ヒイロタケ(*Pycnoporus coccineus*)、ヒラタケ(*Pleurotus octreatus*)、ベッコウタケ(*Fomitella fraxinea*)等に、前記酸化酵素が見出されている。

しかしながら、多くのフェノールオキシダーゼは至適 pH を酸性付近に有することから、使用用途が限定されるという欠点がある。また、中性やアルカリ性に至適 pH を有するフェノールオキシダーゼでは、用いる基質によって至適 pH が大きく変動し、中性付近で種々の基質に効率よく作用しない場合があるという欠点がある。

一方、エノキダケ (*Flammulina velutipes*) は、pH 6.0 の培地で培養することにより、ラッカーゼ活性を発現することが見出されている（特開昭 60-156385 号公報）。

しかしながら、前記ラッカーゼは、酸性側に至適 pH を有する酵素であり、中性やアルカリ性領域の pH では、活性が低下するという欠点がある。

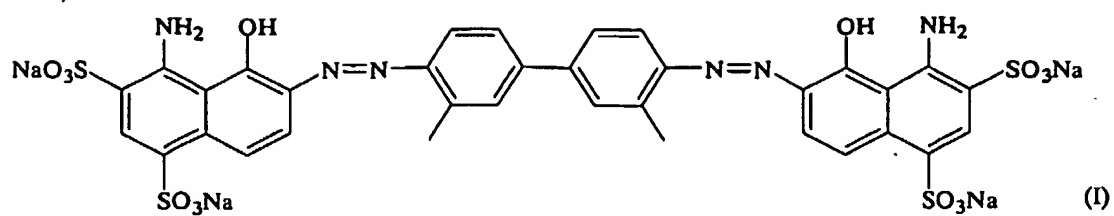
発明の開示

本発明は、種々の化合物、特に、フェノール化合物、アミノフェノール化合物及びジアミノフェノール化合物を基質とする反応に用いることができ、繊維や毛髪の効率的な染色、パルプ及び繊維の漂白、廃液中のフェノール化合物の除去、内分泌攪乱物質の分解、フェノール樹脂の製造、人工漆塗料の製造、木質の改善等への応用性に優れる、*Flammulina* 属に属する菌類由来の培養物を提供することを目的とする。また、本発明は、前記培養物を、簡便に、安価に、かつ大量に得ることができる、培養物の製造方法を提供することを目的とする。さらに、本発明は、種々の染料、具体的には、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物、天然物（フラボノイド等）、動植物の黒色色素構成物等により、効率よく、簡便に染色することができる染色方法を提供することを目的とする。また、本発明は、種々の染料、具体的には、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物、天然物（フラボノイド等）、動植物の黒色色素構成物等による染色を可能にし、取扱いが簡便である染色用組成物を提供することを目的とする。

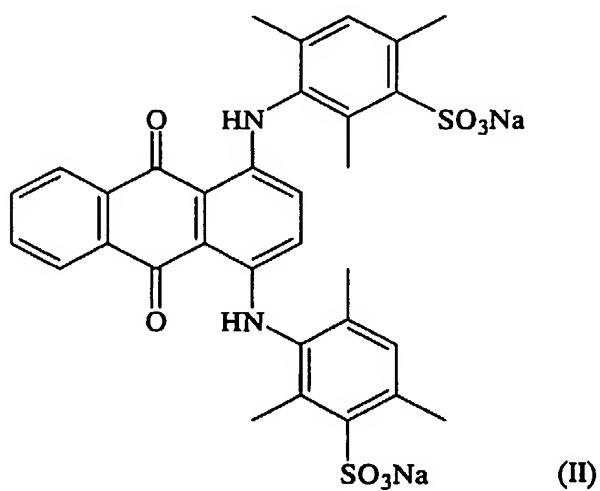
すなわち、本発明の要旨は、

〔1〕 フェノールオキシダーゼ様活性を有し、かつ下記①～⑤：

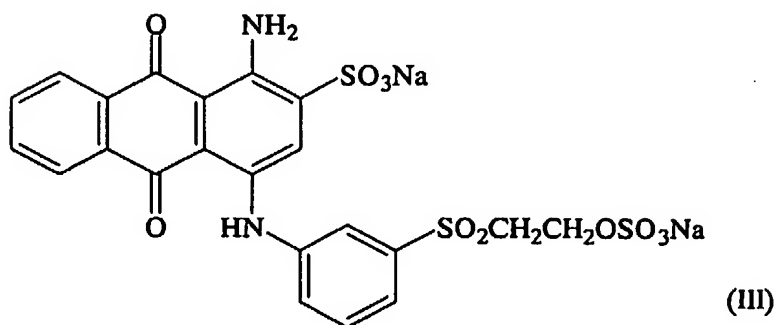
① 式 (I)：



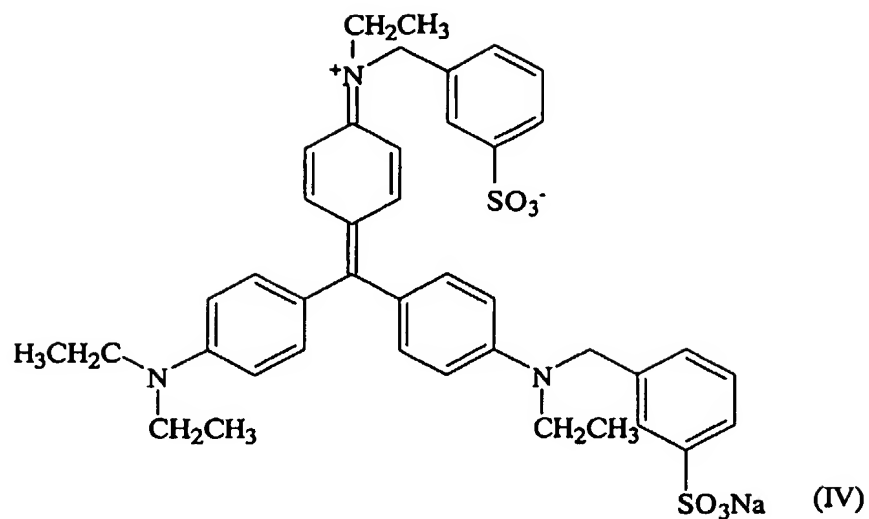
に示されるエバンスブルー、式 (II) :



に示されるアシッドブルー 80、式 (III) :



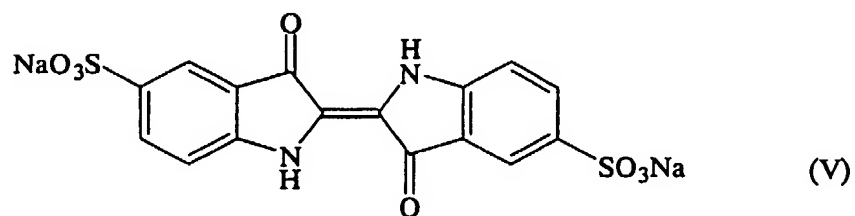
に示されるレマゾールブリリアントブルー R、及び式 (IV) :



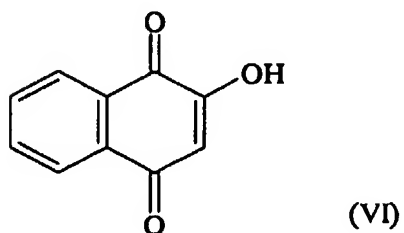
に示されるアシッドバイオレット 17 のそれぞれに対する酸化的脱色反応を触媒する〔脱色活性〕、

② リグニンに対する酸化的分解反応を触媒する〔酸化的分解活性〕、

③ 式 (V) :



に示されるインディゴカルミン、及び式 (VI) :



に示されるナチュラルオレンジ 6 の酸化的重合反応を触媒する〔酸化的重合活

性]

④ 4-アミノアンチピリンと、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物及び複素環化合物からなる群より選ばれた1種の化合物との酸化的カップリング反応を触媒する〔酸化的カップリング活性〕、
、並びに

⑤ フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物及び複素環化合物からなる群より選ばれた1種の化合物に対する直接的酸化反応を触媒する〔直接的酸化活性〕、

からなる群より選ばれた少なくとも1つの基質特異性を有する、フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類由来の培養物、

〔2〕 フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類が、エノキダケ(Flammulina velutipes)である、前記〔1〕記載の培養物、

〔3〕 エノキダケ(Flammulina velutipes)が、Flammulina velutipes IF030601株である、前記〔2〕記載の培養物、

〔4〕 フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類をpH7を超えるpH条件下で培養して、得られた培養液から菌糸体を除去して得られる、前記〔1〕～〔3〕いずれか1項に記載の培養物、

〔5〕 フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類をpH7を超えるpH条件下で培養して、得られた培養液から菌糸体を除去して得られ、かつフェノールオキシダーゼ様活性を有する、フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類由来の培養物、

〔6〕 フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類を培養し、得られた培養液から菌糸体を除去して、培養物を得ることを特徴とする、前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載のフラムリナ(Flammulina)属に属する菌類由来の培養物の製造方法、

〔7〕 フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類が、エノキダケ(Flammulina

velutipes)である、前記〔6〕記載の製造方法、

〔8〕 エノキダケ (*Flammulina velutipes*)が、*Flammulina velutipes* IFO 30601 株である、前記〔7〕記載の製造方法、

〔9〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載の培養物の存在下に、染色対象物と染料とを接触させることを特徴とする、染色方法、並びに

〔10〕 前記〔1〕～〔5〕いずれか1項に記載の培養物を含有してなる染色用組成物、
に関する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の培養物の至適温度を調べた結果を示す図である。図のパネルAは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とする場合を示し、パネルBは、*o*-アミノフェノールを基質とする場合を示す。

図2は、本発明の培養物の熱安定性を調べた結果を示す図である。図のパネルAは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とする場合を示し、パネルBは、*o*-アミノフェノールを基質とする場合を示す。

図3は、本発明の培養物の至適pHを調べた結果を示す図である。図3中、図のパネルAは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とする場合を示し、パネルBは、*o*-アミノフェノールを基質とする場合を示し、パネルCは、*p*-フェニレンジアミンを基質とする場合を示す。

図4は、本発明の培養物のpH安定性を調べた結果を示す図である。図4中、パネルA及びBは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とする場合を示し、パネルC及びDは、*o*-アミノフェノールを基質とする場合を示す。また、パネルA及びCは、1時間後のpH安定性を示し、パネルB及びDは、20時間後のpH安定性を示す。

図5は、本発明の培養物により、ヤク毛束及び羊毛布を染色した結果を示す図である。図5中、パネルAは、ヤク毛束を用いた結果、パネルBは、羊毛布

を用いた場合の結果を示す。

図6は、培養pH条件による活性誘導の変化を調べた結果を示す図である。

図7は、本発明の培養物及びpH6.0で培養して得られた培養物それぞれのフェノールオキシダーゼ様活性の至適pHを比較した結果を示す図である。パネルA及びパネルBは、pH6.0で培養して得られた培養物の至適pH、パネルC及びDは、本発明の培養物の至適pHを示す。また、パネルA及びパネルCは、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、パネルB及びDは、p-フェニレンジアミンを基質として用いた場合を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の培養物は、フェノールオキシダーゼ様活性を有するので、酸素存在下で反応中間体としてのラジカル種の生成に起因する多様な化学反応を触媒的に行なうことができ、また、用いられる基質による至適pHの変動が小さく、中性付近で高い活性を有する。したがって、本発明の培養物によれば、繊維や毛髪の染色、パルプ及び繊維の漂白、廃液中のフェノール化合物の除去、内分泌攪乱物質の分解、フェノール樹脂の製造、人工漆塗料の製造、接着剤の製造等に応用することができるという優れた効果を発揮する。また、本発明の培養物は、食用である後述のエノキダケ(*Flammulina velutipes*)に代表される*Flammulina*属に属する菌類由来のものであるため、菌糸体外に放出される培養生成物から容易に供給することができるという優れた効果を発揮する。

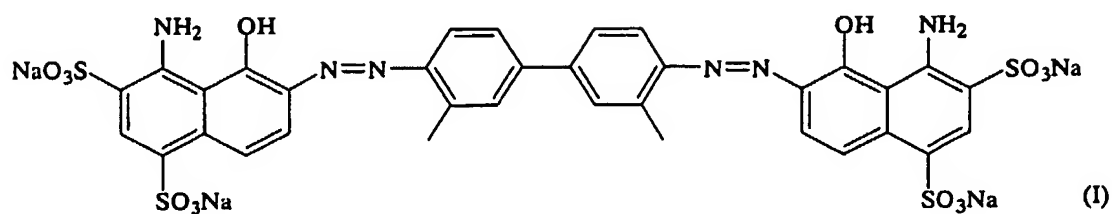
前記*Flammulina*属に属する菌類としては、具体的には、エノキダケ(*Flammulina velutipes*)が挙げられ、より具体的には、*Flammulina velutipes* IF030601株が挙げられる。

本明細書において、フェノールオキシダーゼ様活性とは、酸素存在下で、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、フェニレンジアミン化合物等を触媒的に酸化することをいう。かかるフェノールオキシダーゼ様活性は、例えば、フェノール、アニリン誘導体等を水素供与体として用い、酸素分子を還元する

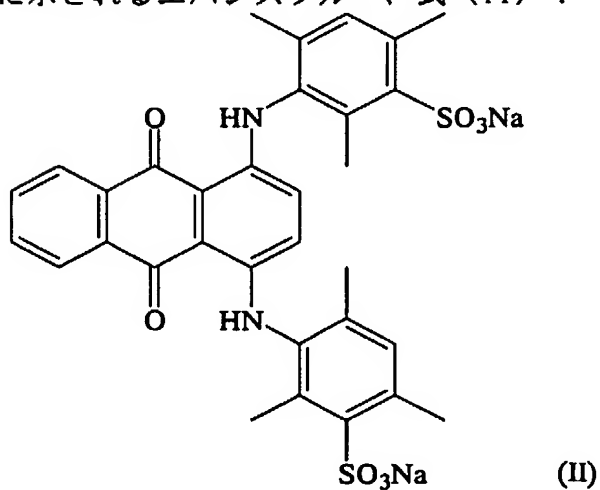
反応による発色反応で測定されうる。前記水素供与体としては、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物、複素環化合物等が挙げられる。

本発明の培養物は、下記①～⑤：

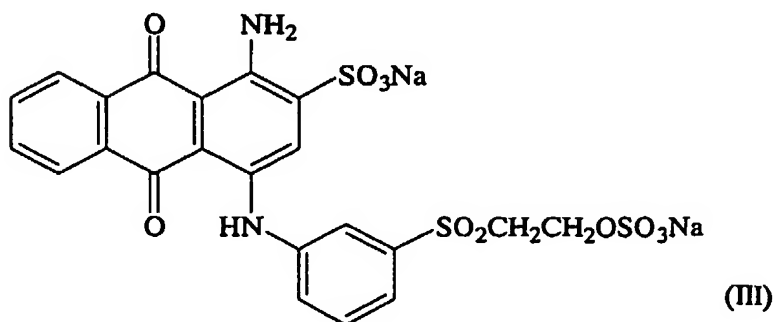
① 式 (I)：



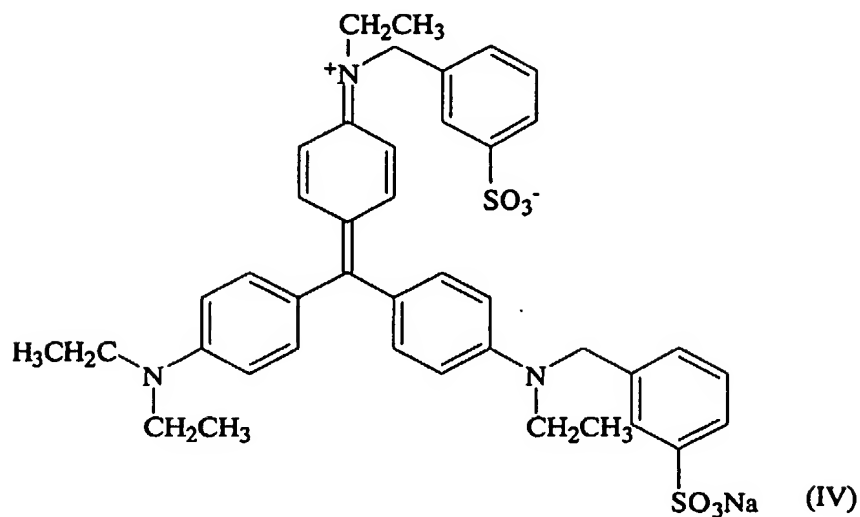
に示されるエバンスブルー、式 (II)：



に示されるアシッドブルー 80、式 (III)：



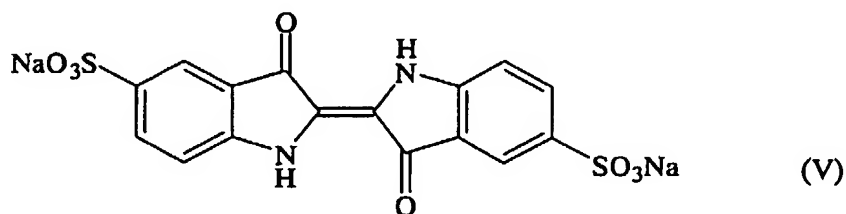
に示されるレマゾールブリリアントブルーR、及び式 (IV) :



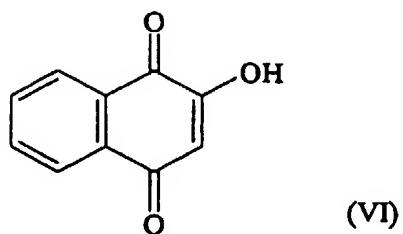
に示されるアシッドバイオレット 17 のそれぞれに対する酸化的脱色反応を触媒する〔脱色活性〕、

② リグニンに対する酸化的分解反応を触媒する〔酸化的分解活性〕、

③ 式 (V) :



に示されるインディゴカルミン、及び式 (VI) :



に示されるナチュラルオレンジ 6 の酸化的重合反応を触媒する〔酸化的重合活性〕

④ 4-アミノアンチピリンと、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、

ジアミノフェノール化合物及び複素環化合物からなる群より選ばれた1種の化合物との酸化的カップリング反応を触媒する〔酸化的カップリング活性〕、

、並びに

⑤ フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物及び複素環化合物からなる群より選ばれた1種の化合物に対する直接的酸化反応を触媒する〔直接的酸化活性〕、

からなる群より選ばれた少なくとも1つの基質特異性を有する。

前記フェノール化合物としては、例えば、フェノール、2-メトキシフェノール、2,6-ジメトキシフェノール、カテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン、ピロガロール、没食子酸、没食子酸プロピル、1-ナフトール、カテキン等が挙げられる。また、前記アミノフェノール化合物としては、例えば、o-アミノフェノール、m-アミノフェノール、p-アミノフェノール等が挙げられる。さらに、前記ジアミノフェノール化合物としては、例えば、o-フェニレンジアミン、m-フェニレンジアミン、p-フェニレンジアミン等が挙げられる。前記複素環化合物としては、5-ヒドロキシインドール、2,6-ジアミノピリジン等が挙げられる。

なお、前記基質特異性に関し、前記①の脱色活性、前記②の酸化的分解活性及び前記③の酸化的重合活性は、

a) 基質（染料、リグニン等）を含有した105.3mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）950 μ lを25℃で、5分間ブレインキュベートして、基質溶液を得るステップ、

b) 前記ステップa)で得られた基質溶液と、本発明の培養物を含有した培養物溶液50 μ lとを混合して、25℃で、60分間インキュベートするステップ、及び

c) 前記ステップb)で得られた産物について、基質に応じた波長における吸光度を測定するステップ

により決定されたものである。ここで、前記染料として、エバンスブルー、アシッドブルー80、レマゾールブリリアントブルーR及びアシッドバイオレッ

ト 17 について、前記ステップ c) において、それぞれ、600 nm、600 nm、600 nm 及び 550 nm の吸光度を測定することにより、各染料に対する脱色活性を評価することができる。また、前記リグニンに関して、前記ステップ c) において、450 nm の吸光度を測定することにより、各染料に対する酸化的分解活性を評価することができる。さらに、前記染料として、インディゴカルミン及びナチュラルオレンジ 6 について、前記ステップ c) において、それぞれ、600 nm 及び 450 nm の吸光度を測定することにより、各染料に対する酸化的重合活性を評価することができる。

また、前記④の酸化的カップリング活性は、

- a) 0.4 μ mol の水素供与体と 4.0 μ mol の 4-アミノアンチピリンとを含有した 105.3 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 190 μ l を、25℃で、1 分間ブレインキュベートして、基質溶液を得るステップ、
 - b) 前記ステップ a) で得られた基質溶液と、本発明の培養物を含有した培養物溶液 10 μ l とを混合して、25℃で、60 分間インキュベートするステップ、及び
 - c) 前記ステップ b) で得られた産物について、水素供与体に応じた波長で吸光度を測定するステップ、ここで、フェノール化合物、ジアミノフェノール化合物及び複素環化合物を基質とする場合、490 nm における吸光度の変化、アミノフェノール化合物を基質とする場合、450 nm における吸光度の変化を測定する
- により決定されたものである。

さらに、前記⑤の直接的酸化活性は、

- a) 0.1 mmol の基質を含有した 0.89 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 180 μ l を、25℃で、1 分間ブレインキュベートして、基質溶液を得るステップ、
- b) 前記ステップ a) で得られた基質溶液と、本発明の培養物を含有した培養物溶液 20 μ l とを混合して、25℃で、60 分間インキュベートするステップ、及び、

c) 前記ステップb) で得られた産物について、基質に応じて、490 nm、450 nm又は405 nmの吸光度の変化を測定するステップにより決定されたものである。

本発明の培養物は、pH 6.0～8.0の範囲で、優れたフェノールオキシダーゼ様活性を示す。本発明の培養物は、前記pHの範囲において種々のフェノール化合物に対して優れたフェノールオキシダーゼ様活性を示すため、特別なpH調整を行なうことなく、効率よく反応を行なうことができるという優れた性質を発現する。

また、本発明の培養物は、20～60℃の範囲で、優れたフェノールオキシダーゼ様活性を示す。本発明の培養物は、前記温度の範囲において優れたフェノールオキシダーゼ様活性を示すため、特別な温度条件に調節することなく、日常生活温度（室温、水温、体温、気温等）で高い活性を示す。したがって、染色、廃液処理、高分子合成等を簡便に行なうことができる。

また、本発明の培養物は、pH 5.0～9.5において、30℃で1時間インキュベートしたとき、インキュベート前の活性と比較して、約75%以上の相対残存活性を保持し、pH 4.0～10.5において、30℃で1時間インキュベートしたとき、インキュベート前の活性と比較して、約40%以上の相対残存活性を保持する。なお、本発明のフェノールオキシダーゼ化合物のpH安定性は、30℃で20時間インキュベートしたとき、インキュベート前の活性と比較して、pH 7.0～9.0において、約75%以上の相対残存活性を保持する。本発明の培養物は、前記pHの範囲において優れたpH安定性を呈するため、特別なpH条件に調節することなく、水ベースの反応溶液を用いることができるという優れた性質を発現する。

さらに、本発明の培養物は、0～40℃において、pH 6.0で1時間インキュベートしたとき、インキュベート前の活性と比較して、約75%以上の相対残存活性を保持する。本発明の培養物は、前記温度の範囲において優れた熱安定性を呈するため、特別な温度条件に調節することなく、日常温度での使用、及び保存が可能であるという優れた効果を発揮する。したがって、染色、廃水

処理、高分子合成等を安価にかつ簡便に行なうことができるという優れた効果を発揮する。

本発明の培養物は、pH 7を超えるpH条件下で、フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類を培養して、得られた培養液から菌糸体を除去して得られた培養物である点にも1つの大きな特徴がある。

本発明の培養物は、pH 7を超えるpH条件下で、フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類から培養されて得られたものであり、pH 6.0～8.0の範囲で、安定で高いフェノールオキシダーゼ様活性を示すという優れた性質を発現する。

なお、本明細書において、「pH 7を超えるpH条件」とは、pH 7を超える値以上であり、pH 13.0以下である条件、好ましくは、pH 7.5～11.0、より好ましくは、pH 8.0～10.0である条件をいう。

本発明の培養物は、Flammulina属に属する菌類を培養して得られた培養液であってもよく、該培養液から菌糸体を除去して得られた産物であってもよい。したがって、Flammulina属に属する菌類を適切な培地で培養し、菌糸体外の培養生成物から簡便に供給することができる。また、除去された菌糸体を、新たな培地で培養することにより、本発明の培養物を得ることができるので、該菌糸体を、リサイクルすることができる。本発明には、本発明の培養物の製造方法も含まれる。

本発明の製造方法は、Flammulina属に属する菌類を培養し、得られた培養液から菌糸体を除去して、培養物を得ることを1つの大きな特徴とする。

本発明の製造方法によれば、前記Flammulina属に属する菌類を培養することにより、フェノールオキシダーゼ様活性を有する培養物を簡便、かつ大量に得ることができるという優れた効果を発揮する。また、除去された菌糸体を、新たな培地で培養することにより、本発明の培養物を得ることができ、リサイクルすることができるため、安価に、かつ簡便に本発明の培養物を簡便に得ることができるという優れた効果を発揮する。

Flammulina属に属する菌類の培養には、液体培地、又は固体培地のいずれを

用いてもよい。

本発明の製造方法に用いられる培地の炭素源としては、例えば、*Flammulina* 属に属する菌類が同化しうるものであればよく、グルコース、ショ糖、糖蜜、でんぷん等の糖類、ふすま、みかんパルプ等が挙げられ、前記炭素源は、単独で、又は2種以上を組み合わせ用いられうる。また、窒素源としては、おから、ペプトン、トリプトン、カザミノ酸、酵母エキス、麦芽エキス、脱脂大豆粉、コーンステープリカー、尿素等の有機窒素源；硝酸カリウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素等が挙げられ、前記窒素源は、単独で、又は2種以上を組み合わせ用いられうる。また、本発明の製造方法に用いられる培地には、必要に応じて、リン酸塩、硫酸マグネシウム、炭酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、カリウム、カルシウム、鉄、銅、亜鉛、マンガン、コバルト等の無機塩類、ビタミン類等を添加してもよい。培地中における前記炭素源、窒素源等の濃度は、本発明の培養物を生産する担子菌、特に、*Flammulina*属に属する菌類を十分に生育させ、フェノールオキシダーゼ様活性を発現させるに適した濃度であればよく、具体的には、炭素源は、0.1～20重量%、好ましくは、1～10重量%であることが望ましく、窒素源は、0.1～10重量%、好ましくは、1～5重量%であることが望ましい。

前記培地のpHは、*Flammulina*属に属する菌類を十分に生育させ、フェノールオキシダーゼ様活性、特に、前記基質特異性を伴うフェノールオキシダーゼ様活性、さらに、前記反応至適pHを伴うフェノールオキシダーゼ様活性を発現させるに適したpHであればよく、前記性質（例えば、基質特異性、反応至適pH等）を伴うフェノールオキシダーゼ様活性を十分発現させる観点から、pH7.0を超えるpH（初期pH）、好ましくは、pH7.5～11.0、より好ましくは、pH8.0～10.0であることが望ましい。したがって、培地を、かかるpHに調整し、滅菌して使用することが望ましい。

培養温度は、糸状株が生育する温度であればよく、実用上、10～40℃、好ましくは、20～35℃であることが望ましい。

なお、*Flammulina*属に属する菌類を液体培養する場合、好ましくは、通気培

養又は振盪培養が望ましい。

培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通気培養の場合は、通常、2～10日間であることが望ましい。また、前記培養時間は、培養液の活性値が最大となることを指標として、設定することもできる。

本発明の培養物は、菌体外に分泌生産され、培養液中に蓄積される。したがって、前記培養液をそのまま用いることもできるが、培養後、菌体等の不要物を遠心分離、濾紙又は濾布等による濾過等により除去し、培養上清として得ることもできる。

また、本発明においては、前記培養液として得られた培養物及び培養上清として得られた培養物について、フェノールオキシダーゼ様活性をより高めてもよく、また、化粧品、医薬部外品等の製品に配合する観点から、脱色、濃縮、凍結乾燥、透析、塩析等に供してもよい。

また、本発明の培養物によれば、種々の染料、色素等とともに用いることにより、ケラチン繊維の染色を行なうことができる。したがって、本発明により、染色方法が提供される。

本発明の染色方法は、培養物の存在下に、染色対象物と染料とを接触させることを1つの大きな特徴とする。本発明の染色方法によれば、本発明の培養物を用いるため、種々の染料により、染色対象物を、安価に、かつ簡便に染色することができる。また、本発明の染色方法によれば、本発明の培養物を用いるため、特別な温度条件、pH条件の調節をすることなく、外界環境条件下において行なうことができる。

前記染色対象物としては、例えば、綿、ジアセテート、亜麻、リンネル、リオセル、ポリアクリル、ポリアミド、ポリエステル、ラミー、レーエン、テンセル、トリアセテート、毛皮、獣皮、皮革、絹又はウール製の布帛、糸、繊維、衣料、木材、毛髪、フィルム等が挙げられる。

前記染料としては、例えば、インドリン及びインドリン化合物、インドール化合物、医薬部外品原料規格に収載されている酸化染料等を基質として酸化することができ、カップリング剤を用いることもできる。

インドリン及びインドリン化合物としては、具体的には、インドリン、5, 6-ジヒドロキシインドリン、N-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、N-エチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、N-ブチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、4-ヒドロキシ-5-メトキシインドリン、6-ヒドロキシ-7-メトキシインドリン、6, 7-ジヒドロキシインドリン、4, 5-ジヒドロキシインドリン、4-メトキシ-6-ヒドロキシインドリン、N-ヘキシル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、2-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、3-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、4-ヒドロキシインドリン、2, 3-ジメチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、2-メチル-5-エチル-6-ヒドロキシインドリン、2-メチル-5-ヒドロキシ-6-β-ヒドロキシエチルインドリン、4-ヒドロキシプロピルインドリン、2-ヒドロキシ-3-メトキシインドリン、6-ヒドロキシ-5-メトキシインドリン、6-ヒドロキシインドリン、5-ヒドロキシインドリン、7-ヒドロキシインドリン、7-アミノインドリン、5-アミノインドリン、4-アミノインドリン、5, 6-ジヒドロキシインドリンカルボン酸、1-メチル-5, 6-ジヒドロキシインドリン、並びにこれらの塩類等を例示されうる。

インドール化合物として、具体的には、4-ヒドロキシインドール、5-ヒドロキシインドール、5, 6-ジヒドロキシインドール、5, 6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸、5, 6-トリ(t-ブトキシカルボニルオキシ)インドール、5, 6-ジ(t-ブトキシカルボニルオキシ)インドール、5-t-ブトキシカルボニルオキシ-6-ヒドロキシインドール、6-t-ブトキシカルボニルオキシ-5-ヒドロキシインドール、5, 6-ジ(エトキシカルボニルオキシ)インドール、5, 6-ジ(エチルカルバモイルオキシ)インドール、1-ピバロイル-5-(ピバロイルオキシメトキシ)-6-ピバロイルオキシインドール、1-ピバロイル-5-ピバロイルオキシメトキシ-6-ヒドロキシインドール、5, 6-(オキシカルボニルメトキシ)インドール等が挙げられる。

医薬部外品原料規格に収載されている酸化染料としては、具体的に、5-ア

ミノ-*o*-クレゾール、*o*-アミノフェノール、*m*-アミノフェノール、*p*-アミノフェノール、2, 6-ジアミノピリジン、5-(2-ヒドロキシエチルアミノ)-2-メチルフェノール、N, N-ビス(β -ヒドロキシ)-*p*-フェニレンジアミン・硫酸塩、*p*-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン、*p*-ニトロ-2', 4'-ジアミノアゾベンゼン・硫酸ナトリウム、トルエン-2, 5-ジアミン、5-アミノ-*o*-クレゾール・硫酸塩、*p*-アミノフェノール・硫酸塩、*o*-クロロ-*p*-フェニレンジアミン・硫酸塩、4, 4'-ジアミノジフェニルアミン・硫酸塩、*p*-メチルアミノフェノール・硫酸塩、*p*-フェニレンジアミン・硫酸塩、*m*-フェニレンジアミン・硫酸塩、トルエン-2, 5-ジアミン・硫酸塩、2, 4-ジアミノフェノキシエタノール・塩酸塩、トルエン-2, 5-ジアミン・塩酸塩、*m*-フェニレンジアミン・塩酸塩、2, 4-ジアミノフェノール・塩酸塩、3, 3'-イミノジフェノール、*p*-フェニレンジアミン・塩酸塩、N-フェニル-*p*-フェニレンジアミン・塩酸塩、N-フェニル-*p*-フェニレンジアミン・酢酸塩、1, 5-ジヒドキシナフタレン、トルエン-3, 4-ジアミン、*p*-メチルアミノフェノール、N, N'-ビス(4-アミノフェニル)-2, 5-ジアミノ-1, 4-キノンジイミン、*o*-アミノフェノール・硫酸塩、2, 4-ジアミノフェノール・硫酸塩、*m*-アミノフェノール・硫酸塩等を例示されうる。

また、本発明においては、2-アミノ-4-ニトロフェノール、2-アミノ-5-ニトロフェノール、1-アミノ-4-メチルアミノアントラキノン、ニトロ-*p*-フェニレンジアミン・塩酸塩、1, 4-ジアミノアントラキノン、ニトロ-*p*-フェニレンジアミン、ピクラミン酸、ピクラミン酸ナトリウム、2-アミノ-5-ニトロフェノール・硫酸塩、レゾルシノール、ニトロ-*p*-フェニレンジアミン・硫酸塩、*p*-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン・硫酸塩、*p*-ニトロ-*m*-フェニレンジアミン・硫酸塩等の直接染料も用いられうる。

培養物の存在下における染色対象物と染料との接触は、例えば、染料と培養物を使用時に混合して染色対象物と接触するか、或いは嫌気性条件下で保存した染料と培養物の混合物を使用時に大気中で染色対象物と接触することにより

行なわれうる。

また、本発明の培養物によれば、染色用組成物が提供される。

本発明の染色用組成物は、本発明の培養物を含有することに1つの大きな特徴がある。したがって、本発明の染色用組成物によれば、酸素の存在下、外界環境条件下において、種々の染料、特に、フェノール化合物と、アミノフェノール化合物と、フェニレンジアミン化合物とのいずれに対しても至適pHに大きな変動がなく、中性付近のpHで効率よく染色を行なうことができるという優れた効果を発揮する。

本発明の染色用組成物において、本発明の培養物の含有量は、実用的な染色時間とする観点から、例えば、毛髪染色用組成物100gに対して、フェノールオキシダーゼ様活性として0.05～100KUとされ、0.5～25KUであることが望ましい。なお、前記フェノールオキシダーゼ様活性は、30mMのp-フェニレンジアミンを基質として用い、25℃の条件下、pH7.0で1分間に490nmにおける吸光度を1増加させる量を1単位(U：ユニット)として定義される値である。

本発明の染色用組成物は、染料若しくは色素、具体的には、前記したインドリン及びインドリン化合物、インドール化合物、医薬部外品原料規格に収載されている酸化染料等を用いることができ、カップリング剤を用いることもできる。また、前記した直接染料も用いることもできる。

本発明の染色用組成物において、染料若しくは色素の含有量は、実用的な染色時間とする観点から、染色用組成物中0.0005～12重量%であり、好ましくは、0.005～6重量%であることが望ましい。

また、本発明の染色用組成物は、本発明の培養物の生理活性を発現させ、染色を行なうに適した酸、アルカリ、それらの緩衝液等により、pHを調整してもよい。具体的には、例えば、塩酸、硫酸等の無機酸；リン酸、酢酸、酒石酸、クエン酸、乳酸、スルホン酸等の有機酸；アンモニア；モノイソプロパノールアミン、モノエタノールアミン等のアミン類；炭酸アンモニウム等の炭酸塩類；水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等の水酸化物塩等を挙げることができる。

る。

本発明の染色用組成物には、フェノールオキシダーゼ様活性を阻害しない範囲で、チオ乳酸、亜硫酸ナトリウム、N-アセチル-L-システイン等の還元剤を配合することができる。また、本発明の効果を損なわない範囲で上記した成分の他、界面活性剤、油性成分、シリコン類、増粘剤、溶剤、水、キレート剤、香料等を適宜配合することもできる。

また、本発明の染色用組成物を毛髪用の染色用組成物とする場合、例えば、嫌気性条件下で、染料と培養物とを含有した一剤式の染色用組成物とし、使用時に毛髪上に塗布して空気と接触させることで毛髪を染色することができる。さらに、培養物を含有した組成物と、染料を含有した組成物との多剤式の染色用組成物とし、使用時に両組成物を混合して毛髪上に塗布して毛髪を染色することもできる。なお、本発明の染色用組成物は、液剤、クリーム剤、ゲル剤等の種々の染色に適した剤型として用いることができる。

本発明の培養物は、フェノールオキシダーゼ様活性を有することから、上記した繊維や毛髪の染色の他、パルプ及び繊維の漂白、廃液中のフェノール化合物の除去、内分泌攪乱物質の分解、フェノール樹脂の製造、人工漆塗料の製造、木質の改善等への利用に有用である。

以下、実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、かかる実施例により、何ら限定されるものではない。

実施例1 エノキダケ[*Flammulina velutipes* (IF030601株)]の培養物の調製

(1) 培養物の調製1

以下の操作をクリーンベンチ内で行なった。

固体培養用寒天培地〔組成：2.4重量% ポテトデキストロースブロス〔ディフコ(Difco)社製〕、2.0重量% 寒天、残部 水〕 10mlを含む滅菌シャーレに、*Flammulina velutipes* (IF030601株)を1白金耳相当量播種し、25℃で10日間培養した。その後、寒天培地全体に成長した菌

糸体を、滅菌した白金耳で5 mm四方の小片に切り分けた。

前記小片 10片を、液体培養用培地1〔組成：2.4重量% ポテトデキストロースブロス〔ディフコ(Difco)社製〕、残部 水 (pH 5.2)；121℃で15分間滅菌したもの〕に播種し、25℃で7日間、往復振盪培養(150往復/分)を行なった。

得られた培養液全量を、2 Lの三角フラスコ中500 mlの前記液体培養用培地に添加し、25℃で3週間、往復振盪培養(100往復/分)を行なった。

その後、成長したペレット状の菌糸体を静置沈殿させ、培養液を取り去り、残部の菌糸体に、液体培養用培地2〔組成：1.0重量% グルコース、0.1重量% 酵母エキス、0.14重量% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.36重量%

K_2HPO_4 、0.02重量% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% ミネラル混合液(組成：1.0重量% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.0重量% ZnCl_2 、0.7重量% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.5重量% $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5重量% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、pH 9.2；121℃、15分間滅菌〕500 mlを添加し、さらに25℃で3日間培養した。

その後、成長したペレット状の菌糸体を静置沈殿させ、デカンテーションにより培養物を回収した。得られた培養物は、淡黄色、又は黄褐色の清澄又は濁った液体であった。

(2) 培養物の調製2

前記(1)で得られた*Flammulina velutipes* IF0 30601株の培養物を、減圧濾過して、濾液を得た。

前記濾液のpHを1 M 水酸化ナトリウム水溶液により7.5に調整した。得られた混合物 1 Lに対して、5 gのDEAE-cellulose〔シグマ(Sigma)社製〕担体を添加し、4℃で30分間振盪攪拌した。その後、10分間静置し、上清を除去した。

得られたDEAE-cellulose担体に、該担体の3倍容量の1 M 塩化ナトリウムを含有した0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)

を添加した。得られた混合物を5分間振盪攪拌して、DEAE-cellulose担体に吸着したタンパク質を溶出した。得られた溶出液を、減圧濾過にて回収し、4℃で脱イオン水に対して透析し、得られた産物を凍結乾燥し、凍結乾燥産物として、培養物を得た。

実施例2 本発明の培養物の反応至適温度

前記実施例1の(2)で得られた培養物(凍結乾燥産物)102mg(タンパク質量:23mg、比活性15U/mg タンパク質)を、0.02mgタンパク質/mlとなるように溶解させて、培養物を得た。

得られた培養物について、フェノールオキシダーゼ様活性を、種々の温度条件(0、20、30、40、50、60、70及び80℃)下にて測定した。具体的には、o-アミノフェノールを基質とする場合、マイクロセントリフュージチューブ〔ポレックスバイオプロダクツインコーポレティッド(Porex BioProducts Inc.)社製〕中、100mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0) 0.89mlと、50mM o-アミノフェノールのジメチルスルホキシド溶液 0.1mlと、培養物溶液 0.01mlとを混合し、得られた混合物について、各反応温度にて10分間反応を行なった。その後、反応液に、2M グリシン塩酸緩衝液(pH3.0) 0.1ml添加することにより、反応を停止させた。また、2,6-ジメトキシフェノールを基質とする場合、前記o-アミノフェノールの場合において、o-アミノフェノールの代わりに、50mM 2,6-ジメトキシフェノール水溶液を用いて同様に操作を行なった。

ついで、得られた各反応産物について、分光光度計〔ジャスコ(Jasco)社製、商品名:V-530〕により、o-アミノフェノールを基質とする場合、420nmにおける吸光度を測定し、2,6-ジメトキシフェノールを基質とする場合、470nmにおける吸光度を測定することにより、活性を評価した。なお、前記活性は、1分間に、吸光度を1増加させる量を1単位(U;ユニット)とした。その結果を図1に示す。なお、図1において、最大

活性を100として、相対活性で示す。また、図のパネルAは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とする場合を示し、パネルBは、o-アミノフェノールを基質とする場合を示す。

図1に示されるように、本発明の培養物の反応至適温度は20～60℃であることがわかった。

実施例3 本発明の培養物の熱安定性

前記実施例2と同様の培養物溶液 0.02mlを、種々の温度条件(0、20、30、40、50、60、70及び80℃)下にて、0.18mlの100mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)中で60分間インキュベートすることにより、前処理を行なった。

o-アミノフェノールを基質とする場合、得られた産物 0.05mlと、100mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0) 0.85ml、50mM o-アミノフェノールのジメチルスルホキシド溶液 0.1mlとを、マイクロキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、420nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ(Jasco)社製、商品名:V-530〕で測定することにより、活性を評価した。また、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とする場合、前記o-アミノフェノールを基質とする場合において、50mM o-アミノフェノールのジメチルスルホキシド溶液の代わりに、50mM 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液を用い、同様の操作を行ない、470nmにおける吸光度の変化を測定することにより、活性を評価した。なお、前記活性は、1分間に、吸光度を1増加させる量を1単位(U;ユニット)とした。その結果を図2に示す。なお、図2において、最大活性を100として、相対残存活性で示す。また、図のパネルAは、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とする場合を示し、パネルBは、o-アミノフェノールを基質とする場合を示す。

図2に示されるように、本発明の培養物は、2, 6-ジメトキシフェノールの場合、40℃までで、84%の相対残存活性、50℃で、45%の相対残存

活性、60℃で22%の相対残存活性を示した。また、*o*-アミノフェノールの場合、本発明の培養物は、40℃までで、91%の相対残存活性、50℃で、62%の相対残存活性、60℃で40%の相対残存活性を示した。

実施例4 本発明の培養物の至適pH

本発明の培養物と各基質との反応に際して、緩衝液として、pHに応じて、0.2M グリシン水酸化ナトリウム緩衝液（pH11.5, pH10.5, pH9.5）、0.2M トリス塩酸緩衝液（pH10.0, pH9.0, pH8.0, pH7.0）、0.2M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.5, pH7.0, pH6.5, pH6.0, pH5.5）、0.2M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5, pH5.0, pH4.5, pH4.0, pH3.5）並びに0.2M グリシン塩酸緩衝液（pH4.0, pH3.5, pH3.0, pH2.0）を用いた。

o-アミノフェノールを基質とする場合、前記実施例2と同様の培養物溶液0.02mlと、前記各種緩衝液0.88mlと、50mM *o*-アミノフェノールのジメチルスルホキシド溶液0.1mlとをマイクロキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、420nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ（Jasco）社製、商品名：V-530〕で測定することにより、活性を評価した。また、2,6-ジメトキシフェノールを基質とする場合、前記*o*-アミノフェノールを基質とする場合において、50mM

o-アミノフェノールのジメチルスルホキシド溶液の代わりに、50mM 2,6-ジメトキシフェノール水溶液を用い、同様の操作を行ない、470nmにおける吸光度の変化を測定することにより、活性を評価した。

p-フェニレンジアミンを基質とする場合、反応に際して、緩衝液として、pHに応じて、0.1M トリス塩酸緩衝液（pH9.0, pH8.5, pH8.0, pH7.5, pH7.0）、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH9.0, 8.5, 8.0, pH7.5, pH7.0, pH6.5, pH6.0）、0.1M クエン酸ナトリウム緩衝液（pH8.0, pH7.5, pH

7.0, pH 6.5, pH 6.0, pH 5.0, pH 4.0, pH 3.0)を用いた。前記培養物溶液 5 μ l と、前記各種緩衝液 0.895 ml と、100 mM p-フェニレンジアミンの水溶液とをマイクロキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、490 nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ (Jasco) 社製、商品名: V-530〕で測定することにより、活性を評価した。

なお、前記活性は、1分間に、吸光度を1増加させる量を1単位 (U; ユニット) とした。その結果を図3に示す。なお、図3において、最大活性を100として、相対活性で示す。また、図のパネルAは、2,6-ジメトキシフェノールを基質とする場合を示し、パネルBは、o-アミノフェノールを基質とする場合を示し、パネルCは、p-フェニレンジアミンを基質とする場合を示す。

図3に示されるように、本発明の培養物は、2,6-ジメトキシフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約6.0、o-アミノフェノールを基質として用いた場合、至適pHは、約6.0、p-フェニレンジアミンを基質として用いた場合、至適pHは、6.5~8.0であることがわかった。

実施例5 本発明の培養物のpH安定性

前記実施例2と同様の培養物溶液 0.02 ml と、pH 2~11.5の各種緩衝液 0.18 ml とを混合して、30℃で1時間又は20時間インキュベートすることにより、前処理を行なった。前処理に際して、緩衝液として、pHに応じて、0.2 M グリシン水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 11.5, pH 10.5, pH 9.5)、0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0, pH 8.0)、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0, pH 6.0)、0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0, pH 4.0) 並びに0.2 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 3.0, pH 2.0) を用いた。

ついで、前処理後の培養物溶液 0.02 ml と、前記緩衝液 0.88 ml

1 と、50 mM α -アミノフェノールのジメチルスルホキシド溶液 0.1 ml とを、マイクロキュベット中にて十分混合し、得られた混合物について、420 nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ (Jasco) 社製、商品名：V-530〕で測定することにより、活性を評価した。また、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とする場合、前記 α -アミノフェノールを基質とする場合において、50 mM α -アミノフェノールのジメチルスルホキシド溶液の代わりに、50 mM 2, 6-ジメトキシフェノール水溶液を用い、同様の操作を行ない、470 nmにおける吸光度の変化を測定することにより、活性を評価した。なお、前記活性は、1 分間に、吸光度を 1 増加させる量を 1 単位 (U; ユニット) とした。その結果を図 4 に示す。なお、図 4 において、最大活性を 100 として、相対残存活性で示す。また、パネル A 及び B は、2, 6-ジメトキシフェノールを基質とする場合を示し、パネル C 及び D は、 α -アミノフェノールを基質とする場合を示す。さらに、パネル A 及び C は、1 時間後の pH 安定性を示し、パネル B 及び D は、20 時間後の pH 安定性を示す。

図 4 に示されるように、本発明の培養物は、1 時間処理の場合、pH 6.0 ~ 10.0 で安定であり、75% の相対残存活性が保持されていた。また、20 時間処理の場合、pH 7.0 ~ 9.0 の範囲で安定であり、75% の相対残存活性が保持されていた。

実施例 6 本発明の培養物の基質特異性

培養物溶液の基質特異性を調べるために、 p -フェニレンジアミン、4-ヒドロキシインドール、2-メトキシフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、カテコール、 p -アミノフェノール、 α -アミノフェノール、ABTS、シリンガルダジン及び L-タイロシンを基質として用い、基質特異性を調べた。具体的には、前記培養物溶液 0.05 ml と、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.85 ml と、基質溶液 (L-タイロシンは、1.1 mM、シリンガルダジンは、1 mM の濃度で使用し、その他は、50 mM の濃度で使用した) 0.1 ml とをマイクロキュベット中にて十分混合し、得られ

た混合物について、420 nmにおける吸光度の変化を分光光度計〔ジャスコ（J a s c o）社製、商品名：V-530〕で測定することにより、活性を評価した。なお、前記活性は、1分間に、吸光度を1増加させる量を1単位（U；ユニット）とした。その結果を表1に示す。

表 1

基質	測定波長 (nm)	U
p-フェニレンジアミン	470	0.101
4-ヒドロキシインドール	470	0.078
2-メトキシフェノール	470	0.117
2, 6-ジメトキシフェノール	470	0.830
カテコール	400	0.029
p-アミノフェノール	400	0.072
o-アミノフェノール	420	0.262
ABTS	420	0.683
シリングアルダジン	530	0.141
L-タイロシン	490	0.018

表1の結果より、本発明の培養物は、フェノールオキシダーゼ様活性を有することがわかった。

次に、実施例1の（2）で得られた培養物の基質特異性について、培養物の作用により生じた種々の基質の化学的変化を、各基質を含有した緩衝液の吸光度の変化を測定することにより調べた。

基質として、市販の色素（エバンスブルー、アシッドブルー80、レマゾールブリリアントブルーR、インディゴカルミン、アシッドバイオレット17、ナチュラルオレンジ）、並びにリグニン（商品名：リグニンアルカリ、東京化成社製）を用いた。なお、各基質についての終濃度及び測定波長を、表2に示す。

表 2

基質		終濃度 (g/ml)	測定波長 (nm)
アゾ系色素	エバンスブルー	0.007	600
アントラキノン系色素	アシッドブルー 80	0.03	600
	レマソールブリリアントブルー R	0.23	600
	インディゴカルミン	0.005	600
その他の色素	アシッドパイオレット 17	0.01	550
	ナチュラルオレンジ 6	0.03	450
リグニン		1.00	450

具体的には、表 2 に記した終濃度となるよう調整した基質を含有した 105.3 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 950 μ l を 25℃ で、5 分間ブレインキュベートし、ついで、得られた産物に、培養物溶液 50 μ l を添加して、キュベット内で反応させ、各基質についての測定波長での吸光度を分光光度計 (島津製作所社製、商品名: UV-2450) を用いて測定した。比較のために、ミロセシウム属菌類由来のビリルビンオキシダーゼについても、上記の緩衝液を、105.3 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に置き換えて、同様に調べた。

なお、活性の 1 単位 [U (ユニット)] は、1 分間に吸光度を 1 減少させる量とした。培養物による活性について、各基質の比活性 (U/mg タンパク質) を表 3 に示す。なお、表 3 中、符号なしで表記された比活性は、分解活性又は脱色活性であることを示し、- (マイナス) により表記された比活性は、重合活性であることを示す。

表 3

基質	測定波長 (nm)	比活性 (U/mgタンパク質)	
		培養物 反応 pH 7.0	ミロセシウム属菌類由来 ビリルビンオキシダーゼ 8.0
アゾ系色素			
エバンスブルー	600	0.32	1.22
アントラキノン系色素			
アシッドブルー 80	600	0.30	0.39
レマゾールブリリアントブルー R	600	0.97	-0.18
その他の色素			
インディゴカルミン	600	-0.22	0.46
アシッドバイオレット 17	550	0.12	-0.40
ナチュラルオレンジ 6	450	-0.18	-0.11
リグニン	450	0.73	-1.63

表 3 に示されるように、本発明の培養物は、中性条件下でアゾ系色素、アントラキノン系色素及びアシッドバイオレット 17 の酸化的脱色反応、リグニンの酸化的分解反応、インディゴカルミン及びナチュラルオレンジ 6 の酸化的重合反応を触媒することがわかった。特に、レマゾールブリリアントブルー R の酸化的脱色反応及びリグニンの酸化的分解反応を強く触媒した。また、本発明の培養物は、比較のために用いたミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼとは、レマゾールブリリアントブルー R、インディゴカルミン、アシッドバイオレット 17、リグニンに対する特異性が大きく異なる。

次に、前記実施例 1 の (2) で得られた培養物の酸化的カップリング反応について、本発明の培養物が触媒する、基質（水素供与体）と 4-アミノアンチピリンとの酸化縮合による発色を指標として測定した。

水素供与体として、フェノール化合物（フェノール、2-メトキシフェノール、2,6-ジメトキシフェノール、カテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン、ピロガロール、没食子酸、没食子酸プロピル、1-ナフトール、カテキン）、アミノフェノール化合物（o-アミノフェノール、m-アミノフェノール、p-アミノフェノール）、ジアミノフェノール化合物（o-フェニレンジ

アミン、*m*-フェニレンジアミン、*p*-フェニレンジアミン)、及び複素環化合物(5-ヒドロキシインドール、2, 6-ジアミノピリジン)を用いた。

4-アミノアンチピリンと、任意の水素供与体とを含む反応系に、前記培養物溶液を添加した後、フェノール化合物、ジアミノフェノール化合物及び複素環化合物については、490 nmにおける吸光度の変化、アミノフェノール化合物については、450 nmにおける吸光度の変化を測定することにより、本発明の培養物の活性を測定した。また、水に対して難溶な基質に対しては、該基質を、少量のジメチルスルホキシドに溶解させ、目的とする濃度まで脱イオン蒸留水で希釈したものを用いた。各基質の測定波長と終濃度を表4に示す。なお、表4中、DMSOは、ジメチルスルホキシドの略称である。

表 4

基質	測定波長 (nm)	終濃度 (mM)
フェノール系化合物		
フェノール	490	2.0
2-メトキシフェノール	490	2.0
2,6-ジメトキシフェノール	490	2.0
カテコール	490	2.0
レゾルシノール	490	2.0
ヒドロキノン	490	2.0
ピロガロール	490	2.0
没食子酸	490	2.0
没食子酸プロピル	490	2.0
		(DMSO 1%)
1-ナフトール	490	2.0
		(DMSO 1%)
カテキン	490	2.0
		(DMSO 1%)
アミノフェノール系化合物類		
o-アミノフェノール	450	2.0
		(DMSO 1%)
m-アミノフェノール	450	2.0
		(DMSO 1%)
p-アミノフェノール	450	2.0
		(DMSO 1%)
ジアミン系化合物類		
o-フェニレンジアミン	490	2.0
m-フェニレンジアミン	490	2.0
p-フェニレンジアミン	490	2.0
複素環化合物		
5-ヒドロキシインドール	490	2.0
		(DMSO 1%)
2,6-ジアミノピリジン	490	2.0
		(DMSO 1%)

表中、「%」は、体積/体積%を示す。

具体的には、96穴のマイクロプレート〔コーニング (Corning) 社製、Costar (登録商標) 3368〕のウェル内で、0.4 μ molの基

質と $4.0 \mu\text{mol}$ の 4-アミノアンチピリンとを含有した 105.3 mM リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) $190 \mu\text{l}$ を、 25°C にて、1 分間ブレインキュベートした。ついで、得られた混合物に、前記培養物溶液 $10 \mu\text{l}$ を添加し、1 時間インキュベートした。得られた産物について、 490 nm 又は 450 nm の吸光度の変化を測定した。なお、酸化カップリング反応に関する活性は、1 分間に吸光度を 1 増加させる量を 1 単位 (U ; ユニット) とした。

また、比較のために、ミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼについても、前記緩衝液を、 105.3 mM トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH } 8.0$) に置き換えて、同様に調べた。各基質に対する比活性 (U/mg タンパク質) を表 5 に示す。

表 5

基質	比活性 (U/mgタンパク質)	
	培養物	ミセシウム属菌類由来 ヒリルビノキシゲナーゼ
反応 pH	7.0	8.0
フェノール系化合物		
フェノール	8.1	0.9
2-メトキシフェノール	14.5	2.5
2,6-ジメトキシフェノール	18.1	12.0
カテコール	23.3	16.0
レゾルシノール	5.7	25.6
ヒドロキノン	2.1	0.5
ピロガロール	3.2	-27.6
没食子酸	0.9	14.9
没食子酸プロピル	-0.2	-0.1
1-ナフトール	18.1	33.0
カテキン	14.0	4.6
アミノフェノール系化合物類		
o-アミノフェノール	22.4	15.1
m-アミノフェノール	8.8	1.3
p-アミノフェノール	12.7	7.0
ジアミン系化合物類		
o-フェニレンジアミン	15.1	4.5
m-フェニレンジアミン	29.7	1.7
p-フェニレンジアミン	20.9	11.1
複素環化合物		
5-ヒドロキシインドール	4.7	1.9
2,6-ジアミノピリジン	37.7	2.3

表 5 に示されるように、本発明の培養物は、中性条件 (pH 7.0) 下で種々のフェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物と、アニリン化合物の 4-アミノアンチピリンとの酸化的カップリング反応を触媒した。フェノール化合物に関しては、没食子酸及び没食子酸プロピル以外の化合物に対して高い活性が見られた。なかでも、2-メトキシフェノール、2,6-ジメトキシフェノール、カテコール、1-ナフトール、カテキンに対して、特に高い活性が見られた。アミノフェノール化合物に関しては、すべて

の化合物に対して高い活性が見られた。なかでも、*o*-アミノフェノール及び *p*-アミノフェノールに対して、特に高い活性が見られた。ジアミノフェノール化合物に関しては、すべての化合物に対して高い活性が見られた。複素環化合物に関しては、すべての化合物に対して高い活性が見られた。なかでも、2,6-ジアミノピリジンに対して、特に高い活性が見られた。

また、表5に示されるように、本発明の培養物は、ミロセシウム属菌類由来ピリルビンオキシダーゼとは、基質特異性が大きく異なっており、比活性も高いことがわかった。

さらに、前記実施例で得られた培養物の直接的酸化反応について、本発明の培養物が基質に直接作用することによって生じる、基質の酸化重合による発色を指標として測定した。

基質として、ジアミノフェノール化合物（2-クロロ 1, 4-フェニレンジアミン、*p*-フェニレンジアミン、2, 5-ジアミノトルエン、*N*-フェニル-*p*-フェニレンジアミン、トルイレン-3, 4-ジアミン、*m*-フェニレンジアミン）、アミノフェノール化合物（*o*-アミノフェノール、*m*-アミノフェノール、5-アミノ-*o*-クレゾール、*p*-アミノフェノール、*p*-メチルアミノフェノール）、及びフェノール化合物（2, 6-ジメトキシフェノール、カテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン、ピロガロール、没食子酸、没食子酸プロピル、1-ナフトール、1, 5-ジヒドロナフタレン、2, 3, 4-トリヒドロキシベンゾフェノン、2, 3, 4, 4-テトラヒドロキシベンゾフェノン）を用いた。水に対して難溶な基質に対しては、該基質を、少量のジメチルスルホキシドに溶解させ、目的とする濃度まで脱イオン蒸留水で希釈したものをを用いた。各基質の測定波長と終濃度とを、表6に示す。なお、表6中、「%」は、体積/体積%を示す。

表 6

基質	測定波長 (nm)	終濃度 (mM)
ジアミン系化合物類		
2-クロロ1, 4-フェニレンジアミン	490	0.50mM (DMSO1%)
p-フェニレンジアミン	490	0.50mM (DMSO1%)
2, 5-ジアミノトルエン	490	0.50mM (DMSO1%)
N-フェニル-p-フェニレンジアミン	490	0.50mM (DMSO1%)
トルイレン-3, 4-ジアミン	490	0.25mM (DMSO1%)
m-フェニレンジアミン	405	0.50mM (DMSO1%)
アミノフェノール系化合物類		
o-アミノフェノール	450	0.50mM (DMSO1%)
m-アミノフェノール	405	0.50mM (DMSO1%)
5-アミノ-o-クレゾール	450	0.50mM (DMSO1%)
p-アミノフェノール	450	0.50mM (DMSO1%)
p-メチルアミノフェノール	450	0.50mM (DMSO1%)
フェノール系化合物類		
2, 6-ジメトキシフェノール	450	0.50mM (DMSO1%)
カテコール	405	0.50mM (DMSO1%)
レゾルシノール	405	0.50mM (DMSO1%)
ヒドロキノン	405	0.50mM (DMSO1%)
ピロガロール	405	0.50mM (DMSO1%)
没食子酸	405	0.50mM (DMSO1%)
没食子酸プロピル	405	0.50mM (DMSO1%)
1-ナフトール	405	0.50mM (DMSO1%)
1, 5-ジヒドロナフタレン	405	0.50mM (DMSO1%)
2,3,4-トリヒドロキシベンゾフェノン	450	0.25mM (DMSO1%)
2,3,4,4-テトラヒドロキシベンゾフェノン	450	0.25mM (DMSO1%)

具体的には、96穴のマイクロプレート〔コーニング (C o r n i n g) 社製、C o s t o r (登録商標) 3368〕のウェル内で、0.1mmolの基質を含有した0.89mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 180 μ lを、25℃で、1分間ブレインキュベートした。ついで、得られた混合物に、前記培養物溶液 20 μ lを添加した。得られた産物について、基質に応じて、490nm、450nm又は405nmの吸光度の変化を測定した。なお、直接的酸化反応に関する活性は、1分間に吸光度を1増加させる量を1単位 (U ; ユニット) とした。

また、比較のために、ウルシ由来ラッカーゼ及びミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼについても、同様にpH7.0における基質特異性を調べた。

代表的な化学染料である2-クロロ 1, 4-フェニレンジアミンを基質とした場合の測定値を100とした、各基質についての相対活性 (%) を表7に示す。

表 7

基質	相対活性 (%)		
	培養物	ウルシ由来 ラッカーゼ	ミロシウム属菌類由来 ヒトリルビンオキシダーゼ
	反応 pH	7.0	7.0
ジアミン系化合物類			
2-クロロ1, 4-フェニレンジアミン	100	100	100
p-フェニレンジアミン	388	142	82
2, 5-ジアミノトルエン	80	44	24
N-フェニル-p-フェニレンジアミン	174	94	102
トルイレン-3, 4-ジアミン	120	61	45
m-フェニレンジアミン	26	4	14
アミノフェノール系化合物類			
o-アミノフェノール	650	103	86
m-アミノフェノール	40	3	3
5-アミノ-o-クレゾール	117	1	19
p-アミノフェノール	235	109	70
p-メチルアミノフェノール	304	308	122
フェノール系化合物類			
2, 6-ジメトキシフェノール	250	21	69
カテコール	21	2	5
レゾルシノール	75	25	91
ヒドロキノン	20	2	4
ピロガロール	184	187	104
没食子酸	65	9	88
没食子酸プロピル	34	14	85
1-ナフトール	17	17	50
1, 5-ジヒドロナフタレン	63	47	69
2,3,4-トリヒドロキシベンゾフェノン	537	175	62
2,3,4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン	571	179	52

表7に示されるように、本発明の培養物は、中性条件（pH 7.0）下で、種々のジアミノフェノール化合物、アミノフェノール化合物及びフェノール化合物の直接酸化反応を触媒した。ジアミノフェノール化合物に関しては、*m*-フェニレンジアミン以外の化合物に対して高い活性が見られた。なかでも、*p*-フェニレンジアミン及び*N*-フェニル-*p*-フェニレンジアミンに対して、特に高い活性が見られた。アミノフェノール化合物に関しては、*m*-アミノフェノール以外の化合物に対して高い活性が見られた。なかでも、*o*-アミノフェノール、*p*-アミノフェノール及び*p*-メチルアミノフェノールに対して、特に高い活性が見られた。フェノール化合物に関しては、2, 6-ジメトキシフェノール、ピロガロール、2, 3, 4-トリヒドロキシベンゾフェノン、及び2, 3, 4, 4-テトラヒドロキシベンゾフェノンに対して高い活性が見られた。なかでも、2, 3, 4-トリヒドロキシベンゾフェノン及び2, 3, 4, 4-テトラヒドロキシベンゾフェノンに対して、特に高い活性が見られた。

また、本発明の培養物は、ウルシ由来ラッカーゼと比べて、*p*-フェニレンジアミン、*m*-フェニレンジアミン、*o*-アミノフェノール、*m*-アミノフェノール、5-アミノ-*o*-クレゾール、*p*-アミノフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、カテコール、レゾルシノール、ヒドロキノン、没食子酸、没食子酸プロピル、2, 3, 4-トリヒドロキシベンゾフェノン及び2, 3, 4, 4-テトラヒドロキシベンゾフェノンに対する活性がより高く、なかでも、*m*-フェニレンジアミン、*o*-アミノフェノール、*m*-アミノフェノール、5-アミノ-*o*-クレゾール、2, 6-ジメトキシフェノール、カテコール、ヒドロキノン及び没食子酸に対する活性がより高い。

また、ミロセシウム属菌類由来ビリルビンオキシダーゼと比べて、*p*-フェニレンジアミン、2, 5-ジアミノトルエン、トルイレン-3, 4-ジアミン、*o*-アミノフェノール、*m*-アミノフェノール、5-アミノ-*o*-クレゾール、*p*-アミノフェノール、*p*-メチルアミノフェノール、2, 6-ジメトキシフェノール、カテコール、ヒドロキノン、没食子酸プロピル、1-ナフトール、2, 3, 4-トリヒドロキシベンゾフェノン及び2, 3, 4, 4-テトラヒド

ロキシベンゾフェノンに対する活性がより高く、なかでも、*o*-アミノフェノール、*m*-アミノフェノール、5-アミノ-*o*-クレゾール、2, 6-ジメトキシフェノール、ヒドロキノン、1-ナフトール、2, 3, 4-トリヒドロキシベンゾフェノン及び2, 3, 4, 4-テトラヒドロキシベンゾフェノンに対する活性がより高い。

実施例7 本発明の培養物による染色

(1) 本発明の培養物による染色性

前記実施例1で得られた培養物による染色試験を行なった。前記培養物により、酸化重合によって、ヤク毛束及び羊毛布を染料(*p*-フェニレンジアミン及び*o*-アミノフェノール)で染色した。すなわち、染料 0.5 g (2種類の染料を用いる場合は、合計1.0 g)と、増粘剤として、ヒドロキシエチルセルロース(HEC) 0.75 gと、界面活性剤として、ポリオキシエチレン(20)硬化ヒマシ油(HC-20) 1.0 gと、乳酸 0.5 gとを混合し、モノエタノールアミンでpHを7.0に調整し、イオン交換水で重量を50 gにし、基材を得た。

前記基材 2 gと前記培養物溶液(3.5 U相当量)とを混合し、得られた混合物を、ヤク毛束1 gと羊毛布1枚(2×3 cm)とに対して、塗布した。塗布後のヤク毛束及び羊毛布のそれぞれを、30℃で1時間保持した。なお、前記培養物溶液における活性は、30 mM *p*-フェニレンジアミンを基質として用い、pH 7.0、25℃の条件下での活性である。

染色されたヤク毛束及び羊毛布について、色差計(ミノルタ社製、商品名: Chromometer CM-3610d)を用いて、L値、a値、b値を測定した。ついで、前記L値、a値、b値に基づき、式1: $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$ により、 ΔE 値を算出し、かかる ΔE 値により、染色性を評価した。なお、前記 ΔE 値は、染色前のヤク毛束及び羊毛布の色調と、染色後のヤク毛束及び羊毛布の色調差を示している。なお、比較のために、ウルシ由来ラッカーゼについても、同様に染色試験を行なった。各基質に対する ΔE 値を表8に示す。

表 8

		ΔE	
		ヤク毛束	羊毛布
p-フェニレンジアミン	酵素なし	9.39	8.02
	ウルシ由来ラッカーゼ	43.66	49.58
		(34.27)	(41.56)
	培養物	42.22	44.53
		(32.83)	(36.51)
o-アミノフェノール	酵素なし	16.84	14.74
	ウルシ由来ラッカーゼ	43.91	38.27
		(27.07)	(23.53)
	培養物	45.63	48.20
		(28.79)	(33.46)
o-アミノフェノール + p-フェニレンジアミン	酵素なし	20.23	14.01
	ウルシ由来ラッカーゼ	33.26	41.35
		(13.03)	(27.34)
	培養物	33.23	39.17
		(13.00)	(25.16)
o-アミノフェノール + m-フェニレンジアミン	酵素なし	20.52	10.59
	ウルシ由来ラッカーゼ	32.66	26.30
		(12.14)	(15.71)
	培養物	38.38	45.54
		(17.86)	(34.95)

表 8 に示すように、本発明の培養物によれば、ヤク毛束及び羊毛布に対して、いずれの染料の組み合わせでも明らかな染色性が認められた。また、本発明の培養物によれば、比較のために用いたウルシ由来ラッカーゼとは、p-フェニレンジアミン単独、o-アミノフェノール+p-フェニレンジアミンにおいて、染色性はやや劣るが、o-アミノフェノール単独及びo-アミノフェノール+m-フェニレンジアミンにおいては、明らかに染色性に優れることがわかった。

(2) 本発明の培養物の使用量の検討

前記実施例 1 で得られた培養物の使用量を変化させ、本発明の培養物による染色試験を行なった。本発明の培養物により酸化される染料 (o-アミノフェノール) を用いて、ヤク毛束及び羊毛布を酸化重合によって染色し、色差計を用いて、L 値、a 値、b 値を測定した。

具体的には、染料（基質）として、*o*-アミノフェノール 0.5 g と、カップラーとして、*m*-フェニレンジアミン 0.5 g と、増粘剤として、ヒドロキシエチルセルロース（HEC） 0.75 g と、界面活性剤として、ポリオキシエチレン（20）ヒマシ油（HC-20） 1.0 g と、乳酸 0.5 g とを混合を混合し、モノエタノールアミンでpHを7.0に調整し、イオン交換水で重量を50 gにし、基材を得た。

また、ヤク毛束1 gと羊毛布1枚（2×3 cm）に対して、前記基材 2 gと、タンパク質量として、0から0.8 mgになるように調整した培養物溶液とを混合し、得られた混合物を、ヤク毛束1 gと羊毛布1枚（2×3 cm）とに対して、塗布した。塗布後のヤク毛束及び羊毛布のそれぞれを、30℃で1時間保持した。

染色されたヤク毛束及び羊毛布について、色差計（ミノルタ社製、商品名：Chromometer CM-3610d）を用いて、L値、a値、b値を測定し、 ΔE を算出した。染色性は、 ΔE 値により評価した。本発明の培養物の使用量による ΔE 値の変化を図5に示す。図5のパネルAは、ヤク毛束を用いた結果、パネルBは、羊毛布を用いた場合の結果を示す。

図5に示されるように、ヤク毛束及び羊毛布において、本発明の培養物の使用量を増加させることにより、 ΔE 値は増加し、ヤク毛束における ΔE 値は、0.2 mg タンパク質相当量の本発明の培養物によって一定値に達し、羊毛布における ΔE 値は、0.5 mg タンパク質相当量の本発明の培養物によって一定値に達した。

実施例8 フェノールオキシダーゼ様活性の誘導条件の検討

（1）菌体の培養

前記実施例1（1）で得られた培養物（液体培養物）を、弱酸性から弱アルカリ性までの範囲の5つの培養pH条件（初期pH：pH5.0、pH6.0、pH7.0、pH8.0、pH9.0）の液体培養用培地2（実施例1記載の培地）で培養し、酸化活性（フェノールオキシダーゼ様活性誘導）の差異を調べた。

前記液体培養物をよく攪拌し、得られた培養物 0.5 ml を、100 ml の活性誘導培地に添加し、28℃の恒温槽内で、振盪培養（振盪速度130回転／分）を10日間行なった。

毎日、1 ml ずつ培養物を採取し、4℃、12,000 rpm で5分間遠心分離し、上清をDISMIC-25cs (0.20 μm) で濾過することにより、菌体を除去した。

得られた試料を4℃で保存した。

(2) 培養pH条件による活性誘導の変化の検討

前記(1)で得られた各試料のフェノールオキシダーゼ様活性を測定することにより、培養pH条件による活性誘導の変化を調べた。

フェノールオキシダーゼ様活性の測定は、基質として、2,6-ジメトキシフェノールを用い、pH6.0の反応pH条件下に、フェノールオキシダーゼ様活性を測定した。

500 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 0.20 ml と、脱イオン蒸留水 0.65 ml と、50 mM 前記基質溶液 0.10 ml と、培養物 0.05 ml とを、セミマイクロキュベットに添加し、攪拌し、室温下、商品名：UV-2400（島津製作所製）で、0～30秒の470 nmにおける吸光度の変化を測定した。培養pH条件による活性誘導の変化を図6に示す。

その結果、図6に示されるように、用いた培地のpHが高くなるほど、2,6-ジメトキシフェノールの反応至適pHであるpH6.0における酵素活性が高くなることがわかる。特に、用いた培地のpHが、pH7.0（培養時pH7.3前後）を超える値である場合、2,6-ジメトキシフェノールの反応至適pHであるpH6.0における酵素活性が高くなることがわかる。

一方、用いた培地のpHが、pH5.0である場合、菌体を10日間培養しても、2,6-ジメトキシフェノールに対する酵素活性は認められなかった。

また、図6に示されるように、用いた培地のpHが、pH9.0である場合、培養10日目における活性は、用いた培地のpHが、pH6.0である場合の培養10日目における活性に比べて、約10倍(0.283/0.027)活性が高いことがわかる。

したがって、培養物におけるフェノールオキシダーゼ様活性は、pH7.0を超えるpHの培地を用いることにより、より誘導されることがわかる。

試験例

(1) 菌体の培養

大豆 250gをミキサーで破碎し、得られた破碎物を、1L容ナス型フラスコに入れ、さらに、ヘキサン 750mlを添加した。得られた混合物を、ヘキサンが淡黄色に変化するまでガラス棒で攪拌した後、オイルバスで85℃で加熱した。加熱開始から1時間後、加熱を終了させ、得られた産物を、アドバンテック(ADVANTEC)社製、No. 2ろ紙で濾過した。

その後、得られた濾物をさらに吸引濾過した。ドラフト内で24時間放置して、ヘキサンを蒸発させ、得られた大豆粕を乾燥させた。

ついで、培地(組成: 2.0重量% グルコース、1.0重量% スクロース、2.0重量% 大豆粕、0.5重量% コーンステープリカー、0.1重量% K_2HPO_4 、0.05重量% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、10 γ /ml、 $FeCl_2 \cdot 6H_2O$ 、pH6.0)を調製した。なお、かかる培地は、特開昭60-156385号公報に記載の培地である。

前記実施例1(1)で得られた培養物(液体培養物) 0.2mlを、前記培地 30mlが入った300ml容三角フラスコに添加し、28℃の恒温槽内で、振盪培養(振盪速度130回転/分)を4日間行なった。ついで、得られた培養液を、前記培地 300mlが入った2L容三角フラスコに添加し、20~25℃の室温条件下で、振盪培養(振盪速度130回転/分)を4日間行なった。

培養終了後、培養液を、アドバンテック（ADVANTEC）社製、No. 2ろ紙を用いて、吸引濾過し、菌体を除去した。その後、得られた濾液を4℃、14,800rpm（30,000×g）で30分間遠心分離し、上清を培養物として得た。得られた培養物は、4℃で保存した。

（2）反応pH条件による酵素活性の変化

フェノールオキシダーゼ様活性の測定には、基質として、2,6-ジメトキシフェノール及びp-フェニレンジアミンのそれぞれを用いた。また、フェノールオキシダーゼ様活性の測定において、pH2.5～4.0ではグリシン塩酸緩衝液、pH4.0～5.5では酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.5～7.5ではリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.5～8.5ではトリス塩酸緩衝液、pH8.5～11.0ではグリシン水酸化ナトリウム緩衝液を用いた。なお、p-フェニレンジアミンを基質として用いる場合、フェノールオキシダーゼ様活性の測定の際、pH3.0～7.0において、クエン酸ナトリウム緩衝液を用いた測定も行なった。

500mM 前記緩衝液 0.20mlと、脱イオン蒸留水 0.65mlと、50mM 前記基質溶液 0.10mlと、培養物 0.05mlとを、セミマイクロキュベットに添加し、攪拌し、室温下、商品名：UV-2400（島津製作所製）で、0～30秒の470nmにおける吸光度の変化を測定した。なお、前記実施例1で得られた本発明の培養物についても同様にフェノールオキシダーゼ様活性を測定した。これらの結果を図7に示す。

その結果、実施例1で得られた本発明の培養物（図7のパネルC及びパネルD）の場合に比べ、前記（1）で得られた培養物（図7のパネルA及びB）の場合は、いずれの基質を用いた場合にも、酸性側に至適pHを有することが示された。

したがって、本発明の培養物におけるフェノールオキシダーゼ様活性と、pH

6. 0の条件下に培養して得られた培養物のフェノールオキシダーゼ様活性とは、明らかに異なることがわかる。

処方例

以下に、本発明に係る染色用組成物の処方例を示す。以下の組成物を白髪の手髪に適用すると、白髪を目立たなく染色することができる。なお、配合量は重量％である。

処方例1（ジェルタイプ）

p-フェニレンジアミン	1.5
レゾルシン	0.3
m-メタアミノフェノール	0.1
実施例1（2）の培養物	0.1
アスコルビン酸ナトリウム	1.0
ヒドロキシエチルセルロース	1.0
クエン酸	適量
モノエタノールアミン	pH 7に調整
精製水	残部
合 計	100.0

処方例2（クリームタイプ）

p-フェニレンジアミン	1.0
p-アミノフェノール	0.8
m-アミノフェノール	0.1
セタノール	6.0
実施例1（2）の培養物	0.05

ポリオキシエチレン（20）セチルエーテル	4.0
塩化ステアリルトリメチルアンモニウム	1.0
L-シスチン塩酸塩	0.2
クエン酸	適量
モノエタノールアミン	pH 7 に調整
精製水	残部
合 計	100.0

処方例3（クリームタイプ）

5,6-ジヒドロキシインドリン	1.0
5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸	0.5
o-アミノフェノール	0.5
エタノール	5.0
ステアリルアルコール	1.5
実施例1（2）の培養物	0.2
ポリオキシエチレン（40）硬化ヒマシ油	3.0
ポリグリセリン脂肪酸エステル	4.0
N-アセチルシスチン	0.1
キサンタンガム	0.5
アキュリン（登録商標）22	0.1
ヒドロキシエチルセルロース	0.1
モノイソプロパノールアミン	適量
モノエタノールアミン	適量
精製水	残部
合 計	100.0

処方例 4 (エアゾールタイプ)

トルエン-2, 5-ジアミン	1. 5
p-アミノフェノール	0. 2
レゾルシン	0. 1
m-アミノフェノール	0. 1
ポリオキシエチレン (15) セチルエーテル	2. 0
プロピレングリコール	5. 0
亜硫酸ナトリウム	0. 3
モノエタノールアミン	適量
クエン酸	適量
実施例 1 (2) の培養物	0. 3
液化石油ガス	4. 0
精製水	残部
合 計	100. 0

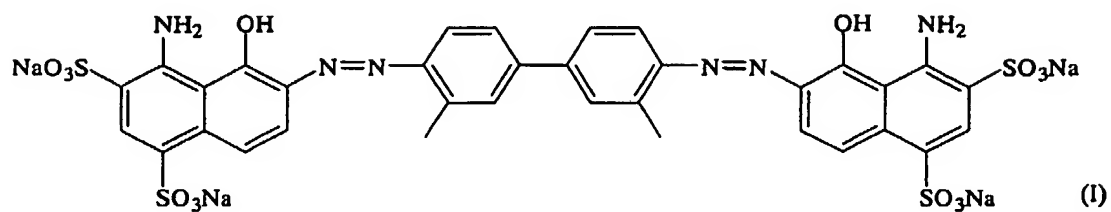
産業上の利用可能性

本発明の培養物によれば、繊維や毛髪の染色、パルプ及び繊維の漂白、廃液中のフェノール化合物の除去、内分泌攪乱物質の分解、フェノール樹脂の製造、人工漆塗料の製造、木質の改善等に利用でき、しかも、安価に、かつ簡便に行なうことができる。また、本発明の培養物の製造方法によれば、簡便に、安価に、かつ大量に前記培養物を得ることができる。さらに、本発明の染色方法及び染色用組成物によれば、外界環境条件下において種々の染料、特に、フェノール化合物、アミノフェノール化合物、フェニレンジアミン化合物のいずれに対しても至適 pH に大きな変動がなく、中性付近の pH で効率よく染色対象物を、安価に、かつ簡便に染色することができ、繊維や毛髪の染色に有用である。

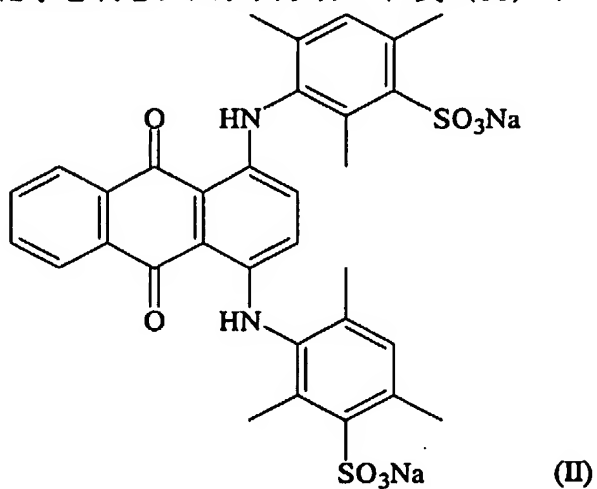
請求の範囲

1. フェノールオキシダーゼ様活性を有し、かつ下記①～⑤：

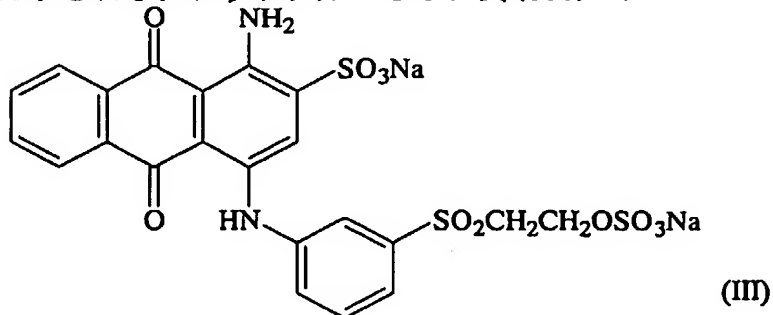
① 式 (I)：



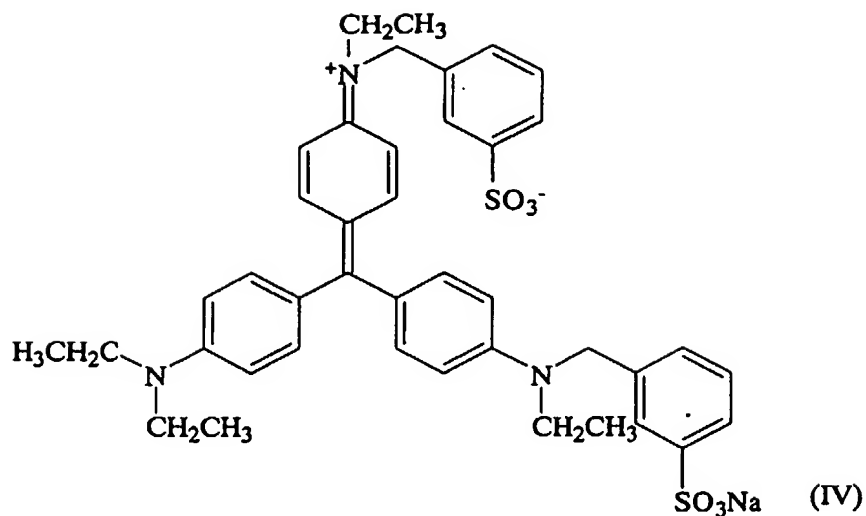
に示されるエバンスブルー、式 (II)：



に示されるアシッドブルー 80、式 (III)：



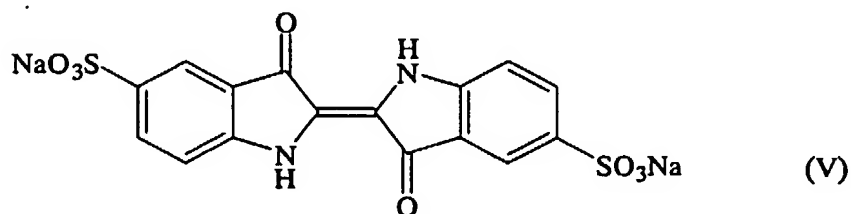
に示されるレマゾールブリリアントブルー R、及び式 (IV)：



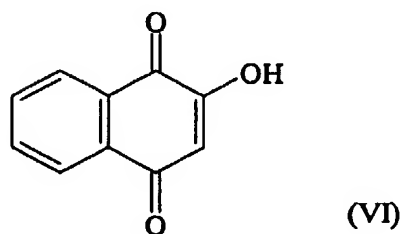
に示されるアシッドバイオレット 17 のそれぞれに対する酸化的脱色反応を触媒する〔脱色活性〕、

② リグニンに対する酸化的分解反応を触媒する〔酸化的分解活性〕、

③ 式 (V) :



に示されるインディゴカルミン、及び式 (VI) :



に示されるナチュラルオレンジ 6 の酸化的重合反応を触媒する〔酸化的重合活性〕

④ 4-アミノアンチピリンと、フェノール化合物、アミノフェノー

ル化合物、ジアミノフェノール化合物及び複素環化合物からなる群より選ばれた1種の化合物との酸化的カップリング反応を触媒する〔酸化的カップリング活性〕、

、並びに

⑤ フェノール化合物、アミノフェノール化合物、ジアミノフェノール化合物及び複素環化合物からなる群より選ばれた1種の化合物に対する直接的酸化反応を触媒する〔直接的酸化活性〕、

からなる群より選ばれた少なくとも1つの基質特異性を有する、フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類由来の培養物。

2. フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類が、エノキダケ(Flammulina velutipes)である、請求項1記載の培養物。

3. エノキダケ(Flammulina velutipes)が、Flammulina velutipes IFO 30601株である、請求項2記載の培養物。

4. pH7を超えるpH条件下で、フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類を培養して、得られた培養液から菌糸体を除去して得られる、請求項1～3いずれか1項に記載の培養物。

5. フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類をpH7を超えるpH条件下で培養して、得られた培養液から菌糸体を除去して得られ、かつフェノールオキシダーゼ様活性を有する、フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類由来の培養物。

6. フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類を培養し、得られた培養液から菌糸体を除去して、培養物を得ることを特徴とする、請求項1～5いずれか1項に記載のフラムリナ(Flammulina)属に属する

菌類由来の培養物の製造方法。

7. フラムリナ(Flammulina)属に属する菌類が、エノキダケ(Flammulina velutipes)である、請求項6記載の製造方法。

8. エノキダケ(Flammulina velutipes)が、Flammulina velutipes IF0 30601株である、請求項7記載の製造方法。

9. 請求項1～5いずれか1項に記載の培養物の存在下に、染色対象物と染料とを接触させることを特徴とする、染色方法。

10. 請求項1～5いずれか1項に記載の培養物を含有してなる染色用組成物。

図 1

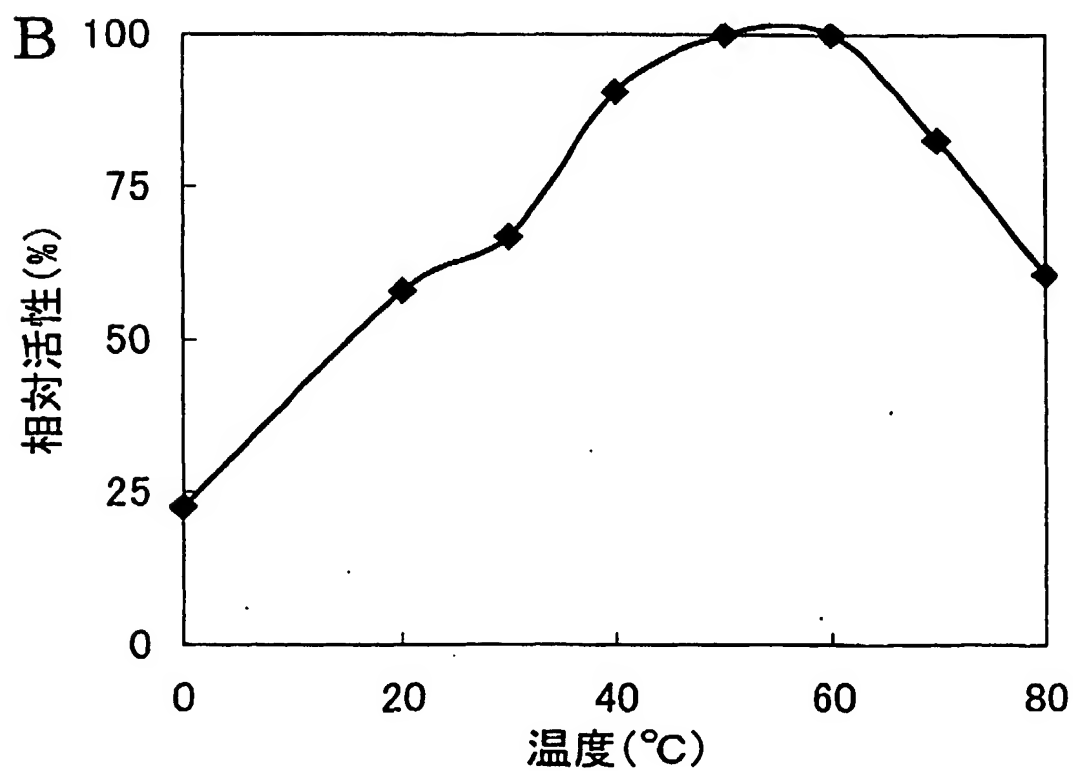
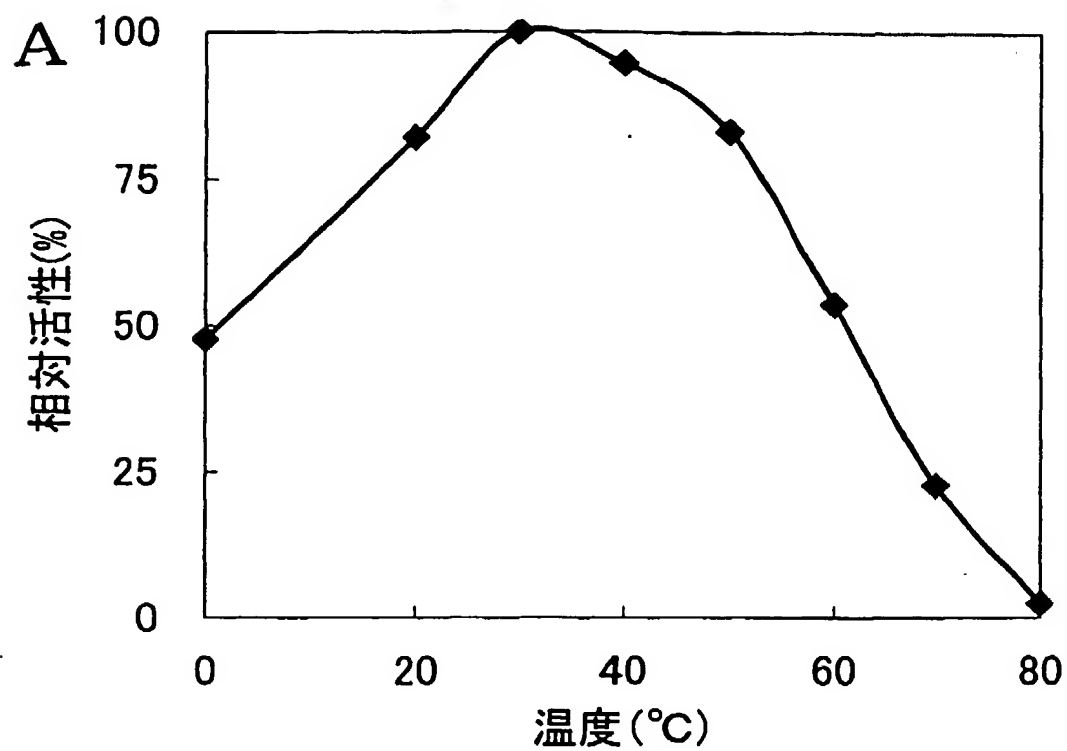


図 2

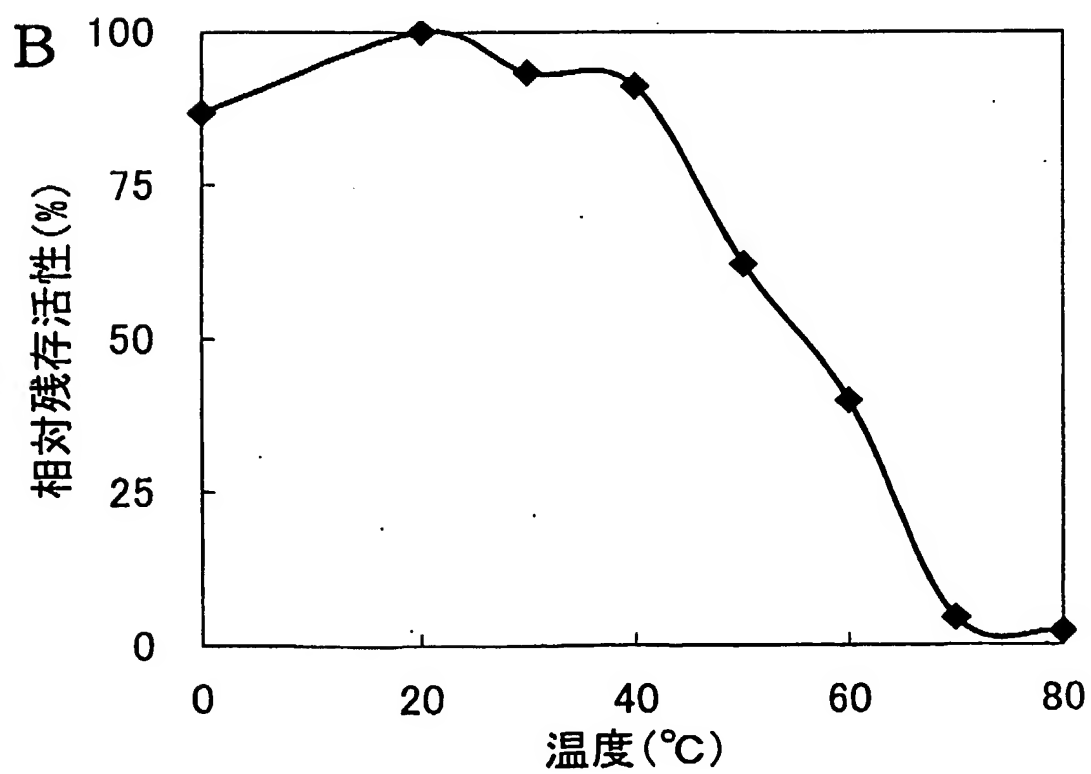
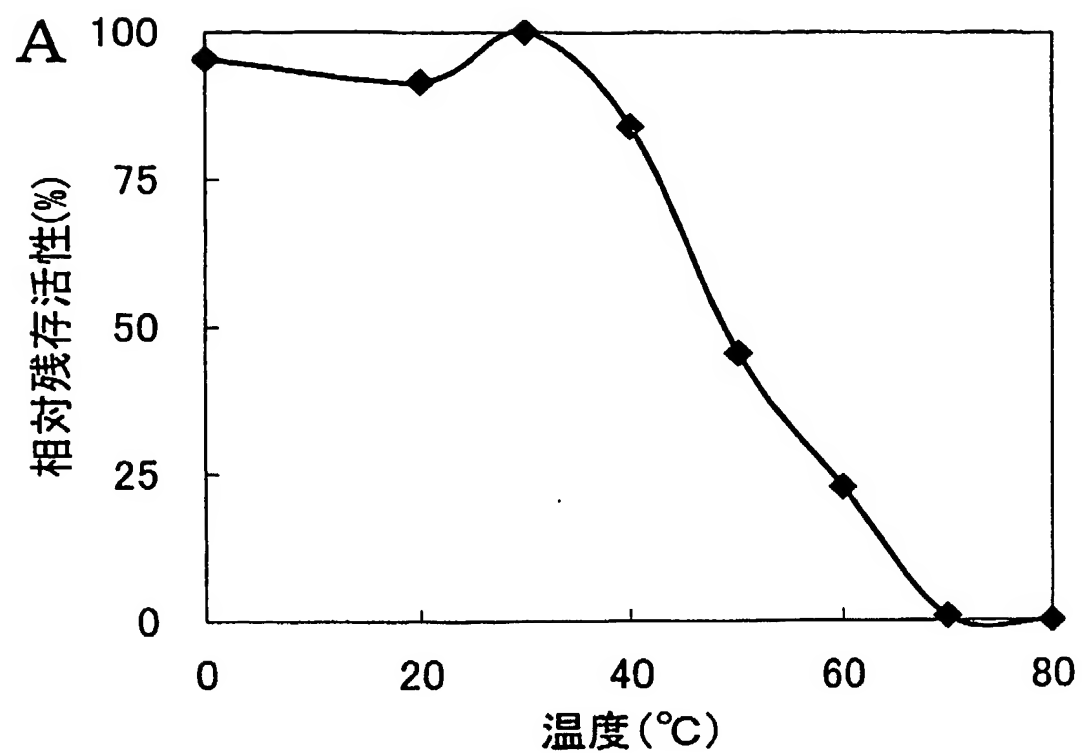


図 3 - 1

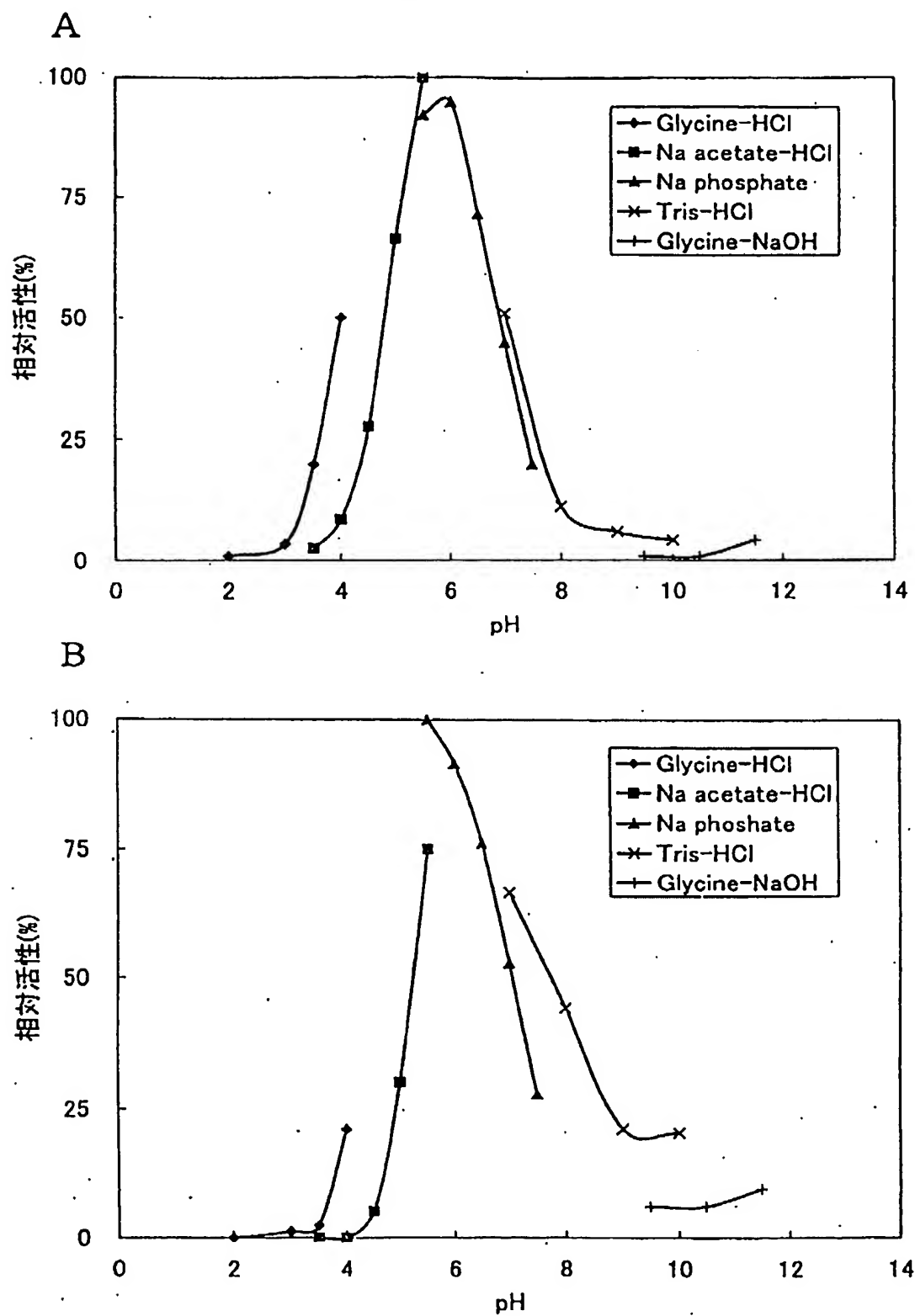


図 3 - 2

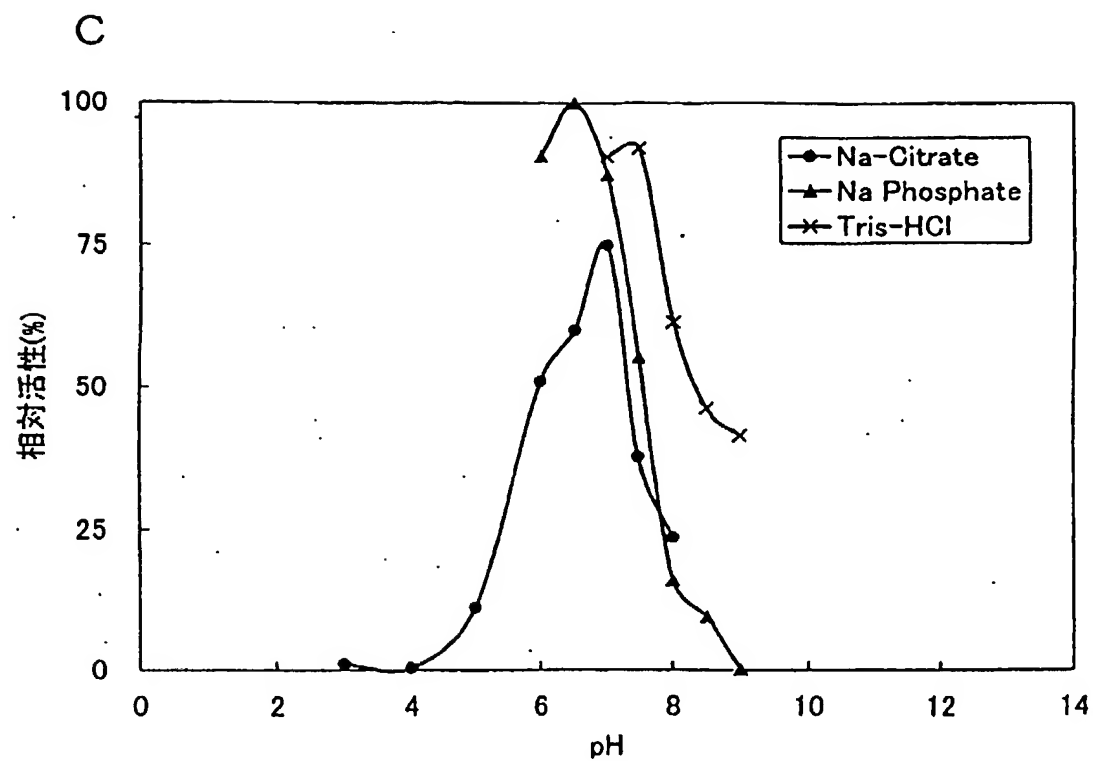
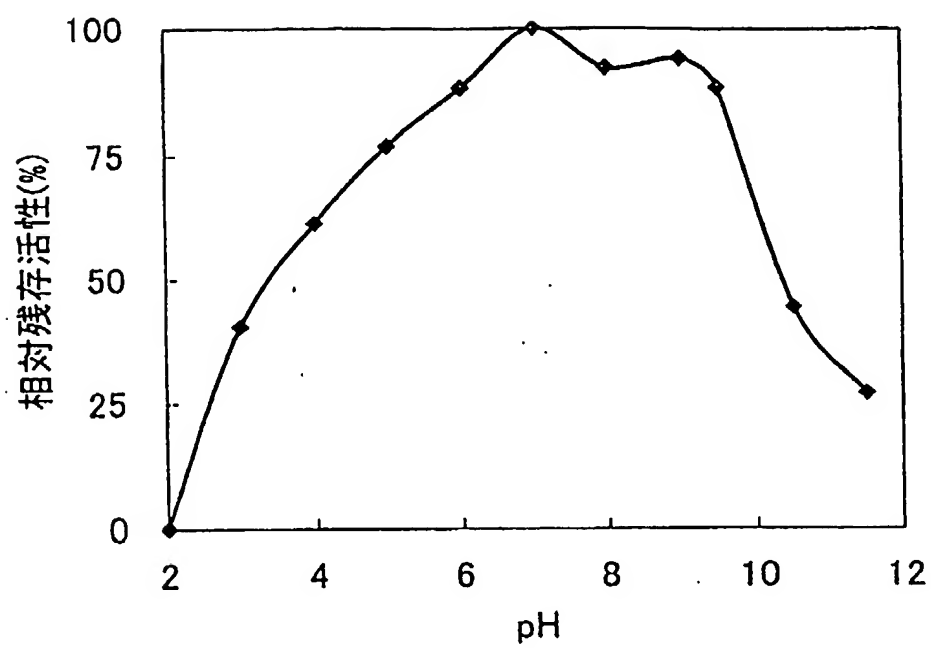


図 4 - 1

A



B

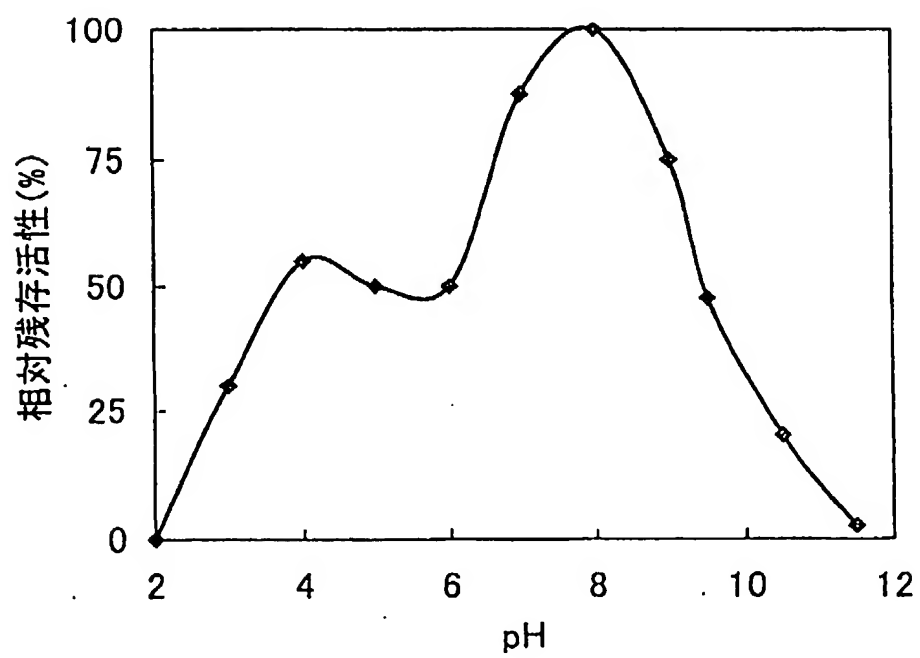
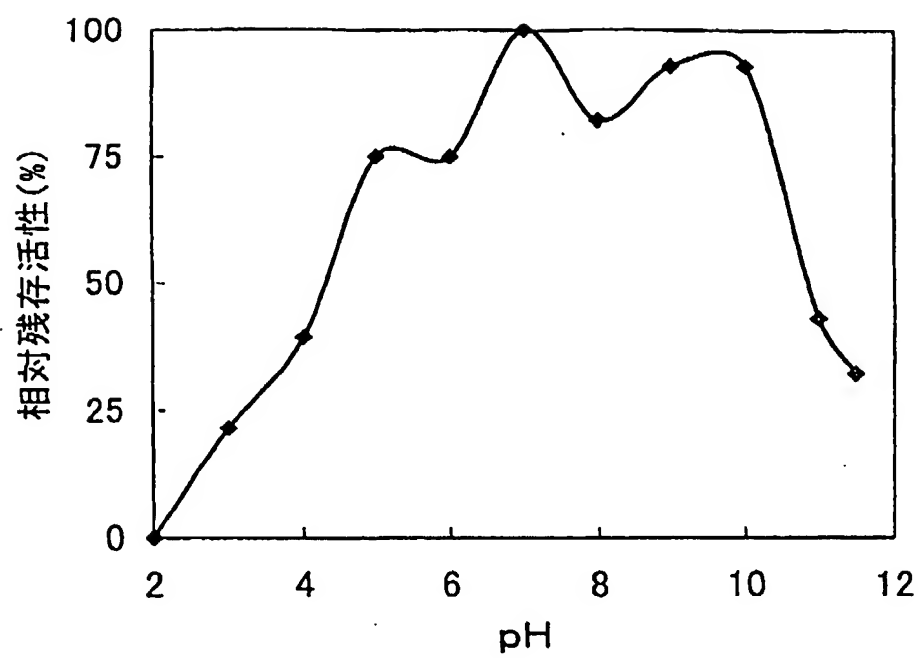


図 4 - 2

C



D

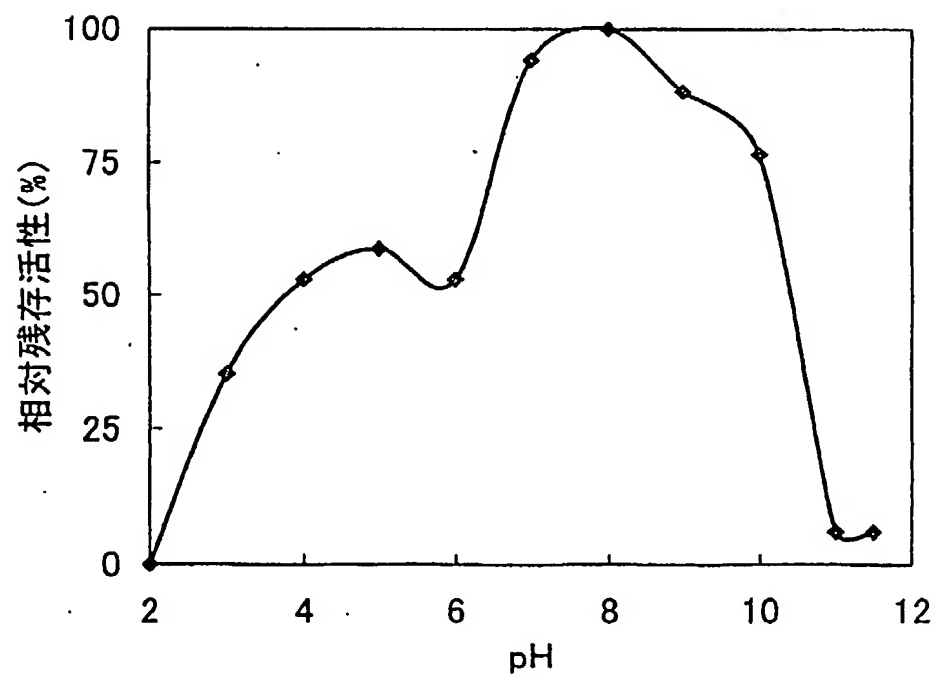


図 5

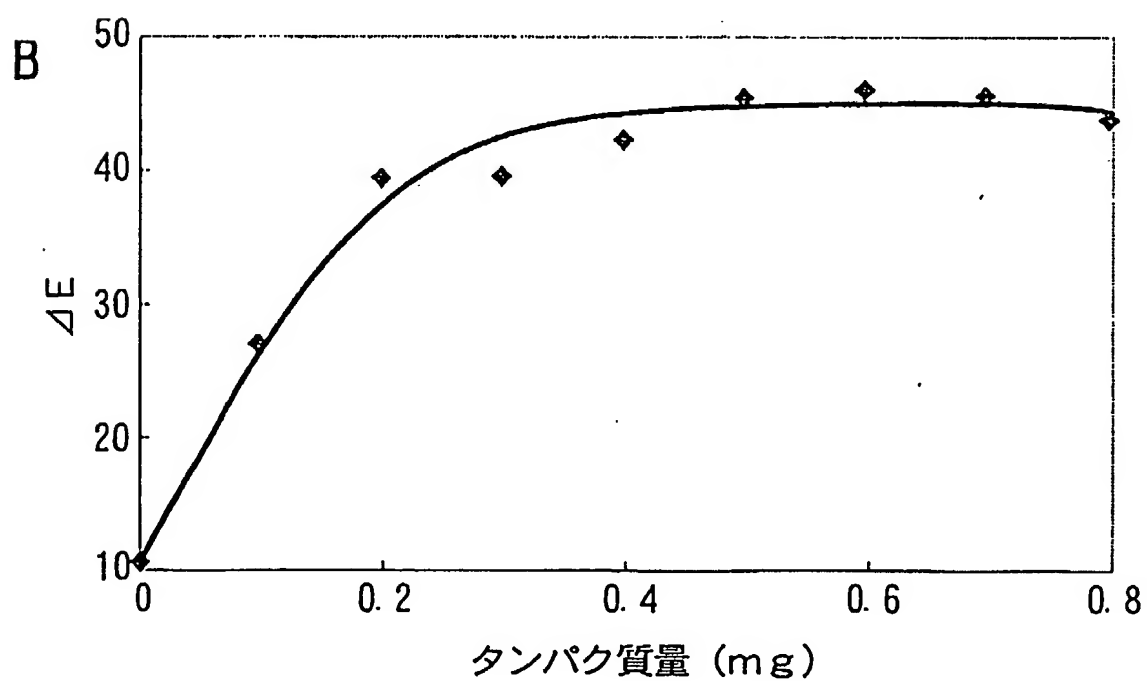
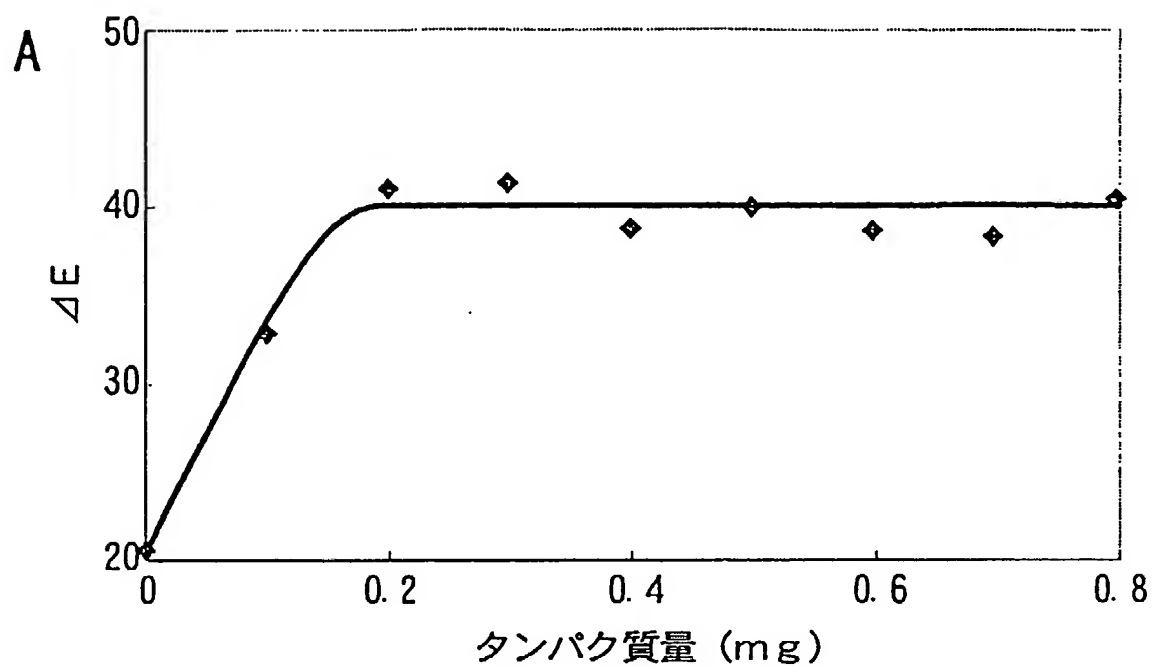


図 6

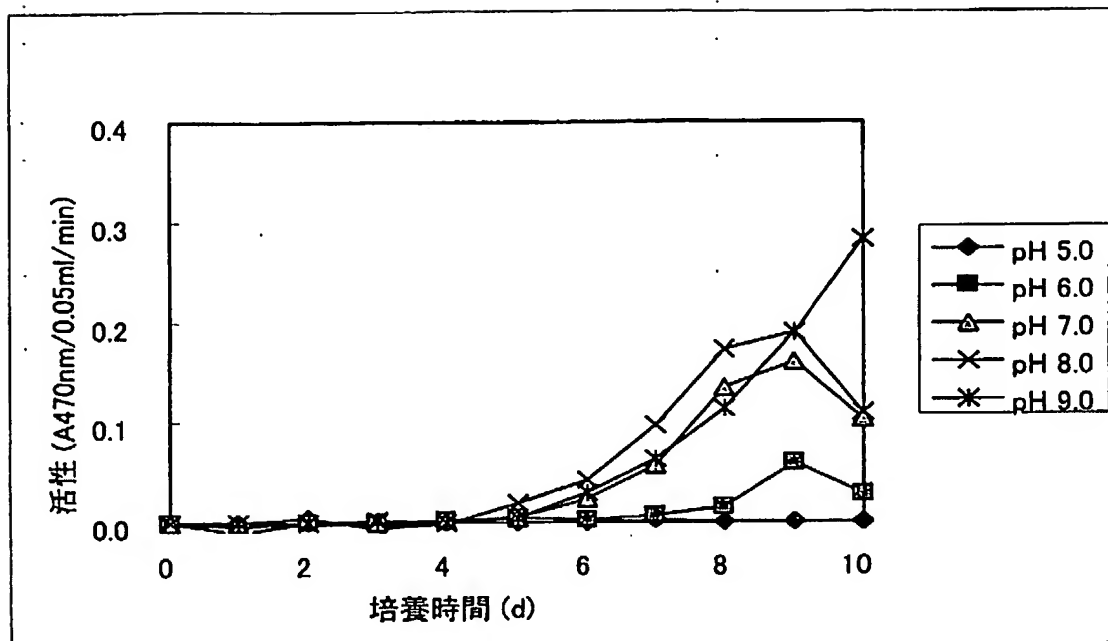


図 7 - 1

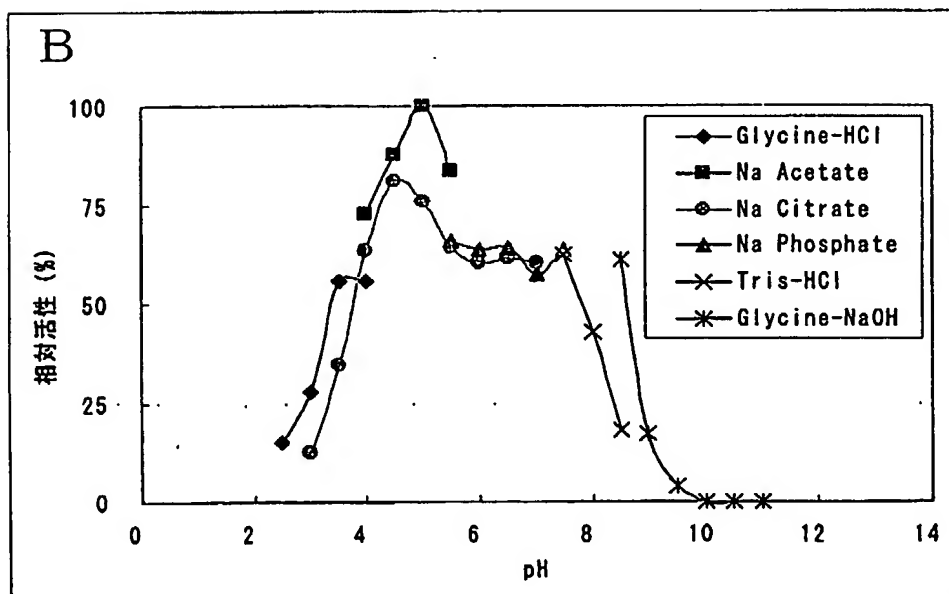
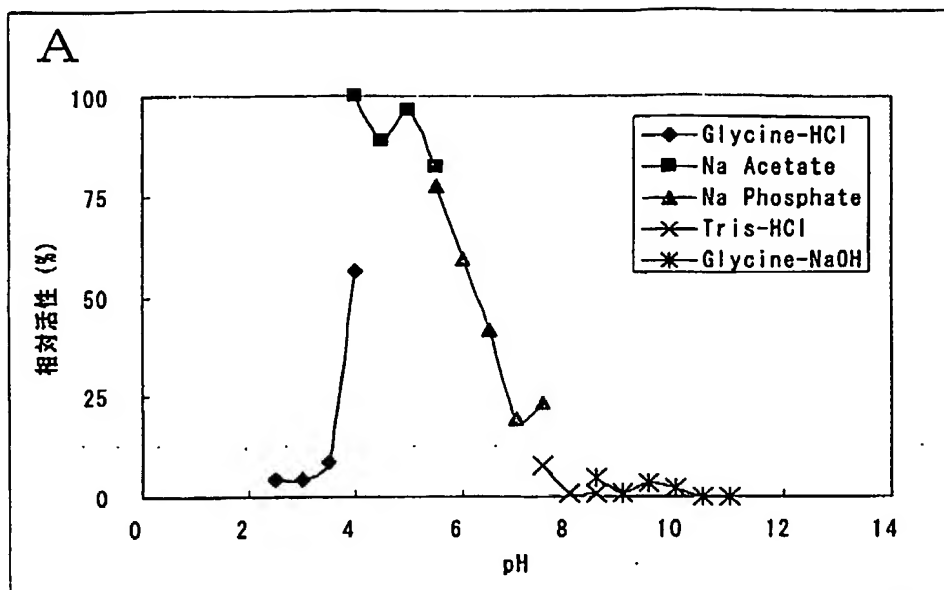
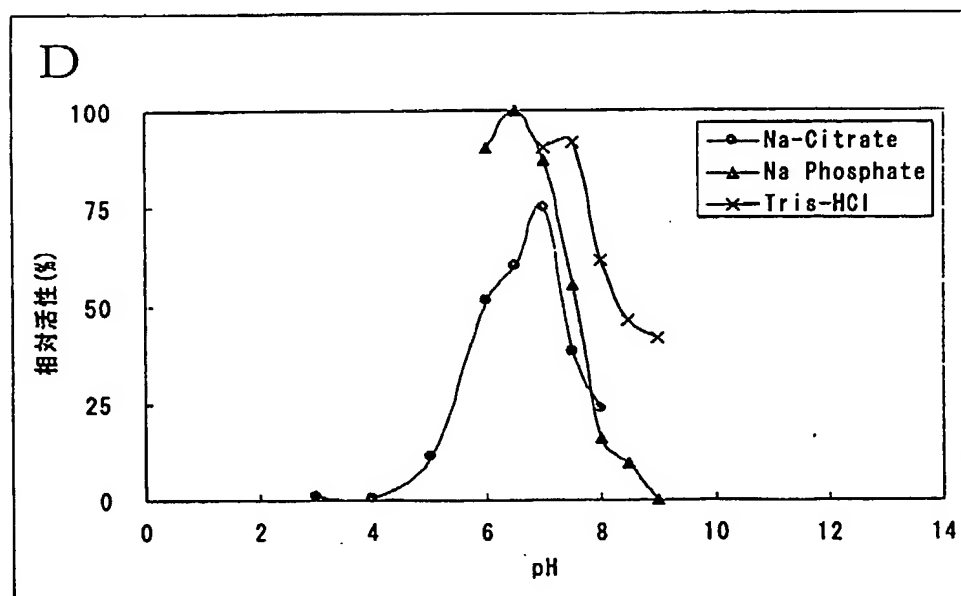
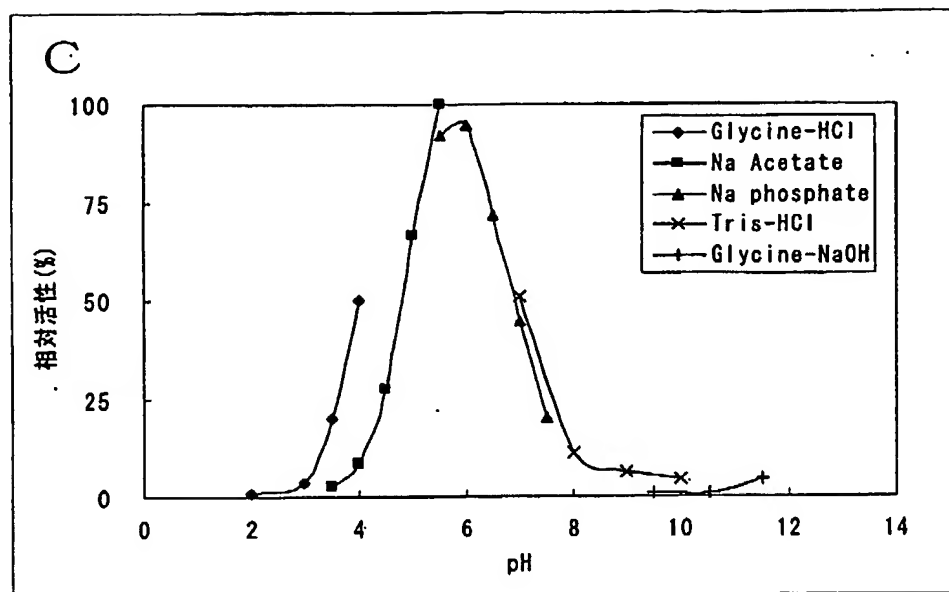


図 7 - 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10897

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/02, D06P3/08// (C12N9/02, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/02, D06P3/08, C12R1:645

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{Y}$ A	JP 60-156385 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 August, 1985 (16.08.85), (Family: none)	$\frac{1-3, 6-8}{9, 10}$ 4, 5
$\frac{X}{Y}$ A	LEE J.S. et al., PRODUCTION AND ENZYMATIC PROPERTIES OF LACCASE FROM FLAMMULINA-VELUTIPES., Korean Journal of Mycology 1985, Vol.13, No.2, pages 111 to 114, (abstract), BIOSIS[online], BIOSIS Accession No. 1985:419838	$\frac{1-3, 6-8}{9, 10}$ 4, 5
$\frac{Y}{A}$	JP 10-262690 A (Showa Denko Kabushiki Kaisha), 06 October, 1998 (06.10.98), & WO 98/32871 A1 & AU 9854974 A	$\frac{9, 10}{1-8}$

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 November, 2003 (27.11.03)

Date of mailing of the international search report
09 December, 2003 (09.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10897

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{Y}{A}$	JP 10-501137 A (Novo Nordisk Biotech, Inc.), 03 February, 1998 (03.02.98), & WO 95/33836 A1 & AU 9526565 A & FI 6904808 A & EP 765394 A1 & BR 9507817 A & KR 97703426 A & US 5795760 A & MX 9606013 A1 & US 5981243 A & CN 1157008 A	$\frac{9,10}{1-8}$
$\frac{Y}{A}$	JP 2001-514513 A (Novo Nordisk A/S), 11 September, 2001 (11.09.01), & WO 98/40471 A1 & AU 9862913 A & EP 973875 A1 & CN 1250475 A & US 6136578 A	$\frac{9,10}{1-8}$

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N9/02, D06P3/08 // (C12N9/02, C12R1:645)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N9/02, D06P3/08, C12R1:645

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	JP 60-156385 A (協和醗酵工業株式会社) 1985. 08. 16 (ファミリーなし)	<u>1-3, 6-8</u> <u>9, 10</u> 4, 5
<u>X</u> <u>Y</u> A	LEE J.S. et al. PRODUCTION AND ENZYMATIC PROPERTIES OF LACCASE FROM FLAMMULINA-VELUTIPES. Korean Journal of Mycology 1985, Vol. 13, No. 2, p. 111-114, (abstract) BIOSIS[online], BIOSIS Accession No. 1985:419838	<u>1-3, 6-8</u> <u>9, 10</u> 4, 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子



4B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	JP 10-262690 A (昭和電工株式会社) 1998. 10. 06 & WO 98/32871 A1 & AU 9854974 A	<u>9, 10</u> 1-8
<u>Y</u> A	JP 10-501137 A (ノボ ノルディスク バイオテック, インコーポレ イティド) 1998. 02. 03 & WO 95/33836 A1 & AU 9526565 A & FI 9604808 A & EP 765394 A1 & BR 9507817 A & KR 97703426 A & US 5795760 A & MX 9606013 A1 & US 5981243 A & CN 1157008 A	<u>9, 10</u> 1-8
<u>Y</u> A	JP 2001-514513 A (ノボ ノルディスク アクティーゼルスラブ) 2001. 09. 11 & WO 98/40471 A1 & AU 9862913 A & EP 973875 A1 & CN 1250475 A & US 6136578 A	<u>9, 10</u> 1-8